

ISSN 0016-6758

Том 59, Номер 2

Февраль 2023



ГЕНЕТИКА



www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 59, номер 2, 2023

Обзорные и теоретические статьи

- Связь аллельных вариантов *A* и *B* гена бета-лактоглобулина с молочной продуктивностью крупного рогатого скота
Е. В. Парыгина, И. С. Кожевникова 127
- Симбиогенетика и симбиогенез: молекулярные и экологические основы интегративной эволюции
Н. А. Проворов, И. А. Тихонович 135

Молекулярная генетика

- Структура и разнообразие ДНК-транспозонов *Tc1/mariner* в геноме ушастой медузы *Aurelia aurita*
Ю. Н. Улупова, Л. В. Пузакова, М. В. Пузаков 147

Генетика животных

- Полиморфизм и дифференциация трех популяций эвронской полевки по данным изменчивости контрольного региона митохондриальной ДНК
И. Н. Шереметьева, И. В. Картавцева, Л. В. Фрисман 157
- Особенности эволюции митохондриальной ДНК байкальских эндемичных губок. I. Митохондриальный геном *Swartschewskia khanaevi*
О. О. Майкова, Д. Ю. Щербаков 170
- Долговременная и сезонная динамика инверсионного полиморфизма малярийного комара *Anopheles messeae* Fall. (Diptera: Culicidae) в популяции центральной части видового ареала (Западная Сибирь, Томская область)
А. К. Сибатаев, И. Э. Вассерлауф, К. Е. Усов, С. С. Алексеева, Г. М. Абылкасымова, В. Н. Стегний 176
- Генетическая дифференциация четырехрогого керчака *Myoxocephalus quadricornis* (Linnaeus, 1758) и его положение в трибе Myoxocephalini Taranetz (Cottidae: Myoxocephalinae)
И. Н. Морева, О. А. Радченко, А. В. Петровская 184

Генетика человека

- Полигенный анализ полиморфных локусов генов цитокинов и иммунного ответа при хронической обструктивной болезни легких
Г. Ф. Корытина, Ю. Г. Азнабаева, О. В. Кочетова, Т. Р. Насибуллин, Л. З. Ахмадишина, Н. Н. Хуснутдинова, Н. Ш. Загидуллин, Т. В. Викторова 196
- Характеристика нового интронного варианта в гене *F5*, ассоциированного с aberrантным сплайсингом и тяжелой формой наследственного дефицита фактора V
О. С. Пиеничникова, Е. В. Яковлева, Н. И. Зозуля, Ю. М. Познякова, Е. Ю. Демидова, В. Л. Сурин 209
- Межгенные взаимодействия и биологические сети заболеваний с нарушениями когнитивных функций человека
А. В. Бочарова, В. А. Степанов 217

Ассоциации полиморфных локусов генов матриксных металлопротеиназ с развитием рака молочной железы у женщин Центрально-Черноземного региона России

*Н. В. Павлова, И. В. Пономаренко, В. С. Орлова, И. В. Батлуцкая,
О. А. Ефремова, М. И. Чурносков*

226

Краткие сообщения

Роль гена *CRP* во влиянии невзгод детства на риск суицидальных попыток у больных с расстройствами шизофренического спектра

*М. В. Алфимова, Т. В. Лежейко, М. В. Габаева, В. В. Плакунова,
В. А. Михайлова, В. Г. Каледа, В. Е. Голимбет*

238

Хроника

Памяти Юрия Евгеньевича Дубровы (13.04.1955–26.01.2023)

244

Contents

Vol. 59, No. 2, 2023

Reviews and Theoretical Articles

- Association of Allelic Variants *A* and *B* of the Beta-Lactoglobulin Gene with Dairy Productivity of Cattle
E. V. Parygina and I. S. Kozhevnikova 127
- Symbiogenetics and Symbiogenesis: Molecular and Ecological Bases of Integrative Evolution
N. A. Provorov and I. A. Tikhonovich 135

Molecular Genetics

- Structure and Diversity of *Tc1/mariner* Transposons in the Genome of the Jellyfish *Aurelia aurita*
Yu. N. Ulupova, L. V. Puzakova, and M. V. Puzakov 147

Animal Genetics

- Polymorphism and Differentiation of the Evoron Vole Three Populations according to the mtDNA Control Region Variability
I. N. Sheremetyeva, I. V. Kartavtseva, and L. V. Frisman 157
- Mitochondrial DNA Evolution Trends of Baikal Endemic Sponges.
I. Mitochondrial Genome of *S. khanaevi*
O. O. Maikova and D. Yu. Sherbakov 170
- Long-Term and Seasonal Dynamics of Inversion Polymorphism of the Malaria Mosquito *Anopheles messeae* Fall. (Diptera: Culicidae) in the Population of the Central Part of the Species Range (Western Siberia, Tomsk Region)
A. K. Sibataev, I. E. Wasserlauf, K. E. Usov, S. S. Alekseeva, G. M. Abylkassymova, and V. N. Stegny 176
- Genetic Differentiation of the Fourhorn Sculpin *Myoxocephalus quadricornis* (Linnaeus, 1758) and Its Position in the Tribe Myoxocephalini Taranetz (Cottidae: Myoxocephalinae)
I. N. Moreva, O. A. Radchenko, and A. V. Petrovskaya 184

Human Genetics

- Polygenic Analysis of Cytokine and Inflammatory Genes Polymorphisms in Chronic Obstructive Pulmonary Disease
G. F. Korytina, Y. G. Aznabaeva, O. V. Kochetova, T. R. Nasibullin, L. Z. Akhmadishina, N. N. Khusnutdinova, N. Sh. Zagidullin, and T. V. Victorova 196
- Characterization of Novel *F5* Intronic Variant Associated with Aberrant Splicing and Severe Factor V Deficiency
O. S. Pshenichnikova, E. V. Yakovleva, N. I. Zozulya, Yu. M. Poznyakova, E. Yu. Demidova, and V. L. Surin 209
- Gene–Gene Interactions and Biological Network Analysis of Diseases with Disturbances of Human Cognitive Functions
A. V. Bocharova and V. A. Stepanov 217
- Associations of Polymorphic Loci of Matrix Metalloproteinase Genes with the Development of Breast Cancer in Women Central Chernozem Region of Russia
N. V. Pavlova, I. V. Ponomarenko, V. S. Orlova, I. V. Batlutskaya, O. A. Efremova, and M. I. Churnosov 226

Short Communications

The *CRP* Gene's Role in the Relations between Childhood Adversity and History of Suicide Attempts in Schizophrenia

*M. V. Alfimova, T. V. Lezheiko, M. V. Gabaeva, V. V. Plakunova,
V. A. Mikhailova, V. G. Kaleda, and V. E. Golimbet*

238

Chronicle

In Memory of Yuri Evgen'evich Dubrova (April 13, 1955–January 26, 2023)

244

ОБЗОРНЫЕ И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 575.174.015.3

СВЯЗЬ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ *A* И *B* ГЕНА БЕТА-ЛАКТОГЛОБУЛИНА С МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТЬЮ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

© 2023 г. Е. В. Парыгина^{1, 2, *}, И. С. Кожевникова^{1, 2}

¹Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики им. академика Н.П. Лаверова
Уральского отделения Российской академии наук, Архангельск, 163069 Россия

²Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова, Архангельск, 163002 Россия

*e-mail: pariginakatyayandex.ru

Поступила в редакцию 17.03.2022 г.

После доработки 14.06.2022 г.

Принята к публикации 07.07.2022 г.

Эффективность селекции крупного рогатого скота по количественным и качественным признакам, имеющим экономическое значение в молочном скотоводстве, во многом зависит от идентификации генов, контролирующих эти признаки, а также их аллельного полиморфизма. Одним из таких генов является ген *LGB*, кодирующий белок бета-лактоглобулин. В обзоре приведена краткая информация о строении и биологической роли белка, полиморфизме гена. Проведен анализ литературных данных различных исследований, позволивших выявить и оценить влияние двух наиболее распространенных аллелей гена *LGB* (*A* и *B*) на показатели эффективности молочного производства.

Ключевые слова: бета-лактоглобулин, *LGB*, генетический полиморфизм, крупный рогатый скот, молочная продуктивность, молочный белок.

DOI: 10.31857/S0016675823020078, **EDN:** KXXOZD

В настоящее время одной из проблем молочного скотоводства является улучшение качественных и количественных показателей молока, от которых зависит рентабельность и экономичность продукции [1, 2]. Эффективность селекционной работы во многом зависит от точности оценки племенной ценности животных. Интеграция же молекулярной генетики в прикладную сферу позволяет оценить потенциал продуктивных качеств крупного рогатого скота непосредственно на уровне ДНК. Одним из способов мобилизации генетических ресурсов животных с целью улучшения желаемых признаков является использование информации о полиморфизме генов, участвующих в формировании химического состава молока и оказывающих влияние на удои [1–4].

Традиционно учитываемый показатель качества молока – это количество молочного белка, включающего в себя две основные группы: казеин (80%) и сывороточные белки (20%) [5]. В число последних и входит бета-лактоглобулин (β -LG), составляющий до 12% от общего числа молочных белков [6–8].

β -LG представляет собой глобулярный белок из одной полипептидной цепи, насчитывающей 162 аминокислотных остатка [6, 9, 10]. Сигнальный пептид состоит из 16 аминокислот, таким образом полная последовательность молекулы β -LG

насчитывает 178 аминокислотных остатков [6]. В сыром молоке β -LG находится в виде димера, связанного за счет образования дисульфидных мостиков четырьмя из пяти остатков цистеина [6–8, 10, 11]. При нагревании свыше 30°C распадается на мономеры. Дальнейшая тепловая денатурация приводит к выпадению в осадок комплекса β -LG и каппа-казеина (κ -казеина). Молекулярная масса β -LG составляет 18 кДа, изоэлектрическая точка соответствует pH 5.1 [8, 10–12].

Биологическая роль β -LG до конца не ясна. В настоящее время установлено, что β -LG связывает жирные кислоты, витамин D, ретинол, а также участвует в транспорте последнего [6, 7]. Кроме того, β -LG стимулирует активность липазы и проявляет антиоксидантную активность в молоке [7, 13]. Однако интерес исследователей к данному белку объясняется также тем, что β -LG представляет собой основной аллерген молока, поскольку он не встречается в грудном молоке человека и вследствие этого может вызывать иммунные реакции у человека [10, 12].

β -LG кодируется геном *LGB* [12], также известным как *PAEP* (progestagen-associated endometrial protein) [4, 14, 15], который расположен на 11-й хромосоме крупного рогатого скота. Он включает в себя семь экзонов и шесть интронов. Об-



Рис. 1. Структура гена *LGB*.

щая длина гена составляет 4662 пн [4, 9, 16, 17]. Структура гена представлена на рис. 1 [18, 19].

В настоящее время известно 15 вариантов строения аминокислотной цепи, из которых 11 изучены наиболее полно и различаются одной или несколькими аминокислотами (табл. 1) [20–23].

Так, во втором экзоне наблюдается аминокислотная замена у β -LG вариантов С, D, F, W, в третьем – у А, Н, в четвертом – у А, G, Н, I, в пятом – у F, J, в шестом – у E, F, G [6]. Информация о нуклеотидных заменах *LGB* представлена в табл. 2 [14, 24, 25].

Из представленных полиморфных форм *LGB* аллели *A* и *B* наиболее изучены, так как отличаются большей частотой встречаемости по сравнению с остальными аллелями [6, 20–23, 26]. Сравнивая их между собой, можно отметить, что аллель *B* встречается несколько чаще, чем аллель *A*. Так, среди коров голштинской породы, которая является самой распространенной среди молочного скота, частота встречаемости аллелей *A* и *B* в среднем составляет 0.45 и 0.55% соответственно

[21, 27–31], хотя есть ряд исследований, приведших к противоположному результату: встречаемость аллеля *A* – 0.55%, *B* – 0.45% [3, 32, 33]. У черно-пестрой породы встречаемость аллеля *B* составляет 0.51% [34], при этом скрещивание с животными голштинской породы увеличивает этот показатель до 0.58–0.61% [20, 35, 36]. Такой же уровень частоты встречаемости установлен и для помесных животных пород гузера (*Guzerá*) и голштинской [37]. У холмогорских коров этот показатель также составляет около 0.6% [34, 38], а у датских красных доходит до 0.75% [36]. Для симментальской же породы характерна обратная тенденция: снижение частоты встречаемости аллеля *B* в среднем до 0.45% [23, 39, 40], а в некоторых популяциях даже до 0.32% [34].

Указанные варианты различаются двумя аминокислотными замещениями: в положениях 64 и 118 аллель *A* содержит аспарагиновую кислоту (Asp) и валин (Val), в то время как аллель *B* – глицин (Gly) и аланин (Ala) соответственно (табл. 1) [17, 20, 21].

Таблица 1. Некоторые варианты строения аминокислотной цепи β -LG

Варианты β -LG	Положение аминокислот											
	45	50	56	59	64	70	78	108	118	126	129	158
A					Asp				Val			
B	Glu	Pro	Ile	Gln	Gly	Lys	Ile	Glu	Ala	Pro	Asp	Glu
C				His								
D	Gln											
E		Ser										Gly
F											Tyr	Gly
G							Met					Gly
H					Asp	Asn			Val			
I								Glu				
J										Leu		
W			Leu									

Таблица 2. Информация об однонуклеотидном полиморфизме (SNP) гена *LGB*

RS ID	Позиция на хромосоме	Нуклеотидная замена		Вариант β -LG
		эталон	альтернатива	
rs211077340	103257028	G	C	D
rs209252315	103257061	A	C	W
rs210096472	103257072	G	T	C
rs110066229	103257950	G	A	A
rs109625649	103259232	C	T	B

После открытия полиморфизма *LGB* его влияние на количественные и качественные, лактационные и технологические свойства коровьего молока стало предметом многочисленных исследований [3, 21–23].

Так, к настоящему времени сложилось представление, что аллель *A* в большей степени влияет на повышение величины удоев, чем аллель *B*. В свою очередь показано, что аллель *B* положительно влияет на состав и качество молока [16, 21, 22, 26, 27]. Результаты исследований оценки влияния аллелей *A* и *B* *LGB* на молочную продуктивность не всегда совпадают. Вероятно, это связано с биологическими особенностями выбранного объекта изучения: породой крупного рогатого скота, периодом лактации, условиями его содержания и кормления и другими [41], а также с отсутствием единой методологической базы исследований.

При оценке влияния того или иного генотипа на качественный состав молока особое внимание уделяется таким показателям молочной продуктивности как величина удоев, содержание белка и жира [3, 26].

Удои — основная количественная характеристика производительности лактирующих сельскохозяйственных животных. В отношении влияния полиморфизма *LGB* на рассматриваемый показатель крупного рогатого скота большинство исследований отмечают увеличение удоев у животных с генотипом *AA* [21, 23, 27, 33, 39]. Например, И.А. Погорельский и М.В. Позовникова (2014) при изучении голштинизированных коров черно-пестрой породы ($n = 105$), входящих в племенное ядро агрофирмы в Псковской области, установили, что коровы с генотипом *AA* имели преимущество над сверстницами с генотипами *AB* и *BB* по удою на 295 и 178 кг соответственно [16].

К похожим выводам пришли В. Soyudal и соавт. (2018), которые исследовали влияние полиморфизма *LGB* на молочную продуктивность на чистопородных голштинских коровах ($n = 189$). В результате было установлено, что для животных с генотипом *AA* такие показатели как общий удой, 305-дневный удой и пиковый удой составляют 8942, 8814 и 34.50 кг соответственно, для *AB* — 8694, 8497 и 34.88 кг, а для *BB* — 8320, 8039 и 33.76 кг

[21]. Проанализировав полученные данные, можно выявить некоторую тенденцию повышения удоев у коров, чей генотип *LGB* содержит аллель *A*. Однако F.F. Zinnatov с соавт. (2020), также проведя генотипирование животных голштинской породы и анализ зависимости величины удоев от генотипа, обнаружили, что наибольшее фактическое количество молока за 305 дней лактации характерно для особей с генотипом *BB* и составило 6634.40 кг, для генотипов *AA* и *AB* — 6432.40 и 6483.60 кг соответственно. Кроме того, было рассчитано, что экономическая эффективность носителей с генотипом *BB* выше на 19.4% [3].

Также имеются данные о статистически значимом влиянии генотипа *AB* на величину удоев. Так, Dragan Nikšić с соавт. (2021) проанализировали 157 симментальских коров и в результате установили, что самые высокие значения рассматриваемого показателя имели животные с генотипом *AB* по сравнению с гомозиготными вариантами *LGB*. Они дали 6624.29 кг молока за 305 дней, или на 338.29 и 120.94 кг больше, чем коровы генотипов *AA* и *BB* соответственно ($p \leq 0.001$) [23]. К такому же результату в своем исследовании на животных той же самой породы пришли Neamt Radu с соавт. (2017) ($p < 0.033$) [39]. Вероятно, повышение удоев у симментальских коров с генотипом *AB* по сравнению с другими полиморфными формами является видоспецифической особенностью.

Другой важный показатель молочной продуктивности крупного рогатого скота — содержание молочных белков, определяющих биологическую ценность молока и его производных [5]. Как уже было сказано, аллель *B* *LGB* в большей степени оказывает положительное влияние на выход указанного выше параметра, чем аллель *A* [16, 21–23, 27, 32]. Например, О.А. Епишко и соавт. (2018) в результате своего исследования на коровах белорусской черно-пестрой породы ($n = 102$) установили повышение содержания белка в третьей лактации у особей с генотипом *BB* на 15.7–18.6 кг по сравнению с показателями животных с генотипами *AA* и *AB* ($p < 0.05$; $p < 0.01$), при этом увеличение жирно- и белкомолочности составило 0.03–0.06% [42].

Некоторые же авторы в своих исследованиях пришли к выводу, что генотип *AB* *LGB* имеет пре-

имущество по сравнению с гомозиготными вариантами этих аллелей. Например, Dragan Nikšić с соавт. (2021), проведя исследование коров симментальской породы ($n = 157$), установили, что наибольший выход молочного белка за 305 дней лактации (214.66 кг) наблюдался у животных с генотипом *AB*, что больше по сравнению с генотипами *AA* и *BB* на 10.2 и 4.16 кг соответственно. Однако различия в процентном содержании белка в молоке незначительны и составляют 0.02%. При этом изменчивость признаков, обусловленная генетическим полиморфизмом *LGB*, была статистически достоверна ($p < 0.05$) [23]. Однако имеются и противоположные результаты. Так, Е.Н. Рачкова (2016), оценив влияние генотипа *LGB* на качественные характеристики 184 голов крупного рогатого скота, пришла к выводу, что животные с генотипом *AB* имели наименьшие показатели продуктивности. У таких особей выход молочного белка за стандартную лактацию был меньше на 26.8 кг (13.5%) по сравнению с генотипом *BB*, при этом существенных различий между полиморфными формами *AA* и *BB* выявлено не было [1].

Не менее важный показатель молочной продуктивности — содержание жира, который благодаря своим уникальным свойствам является концентрированным источником энергии [43, 44]. Сравнивая влияние полиморфных форм *LGB*, большинство авторов сходятся во мнении, что коровы, чей генотип содержит аллель *B*, характеризуются более высокими значениями рассматриваемого показателя [16, 21–23, 27, 32]. Например, О.А. Епишко, проведя исследование белорусской черно-пестрой породы ($n = 102$), пришел к выводу, что генотип *BB* оказывает наибольший положительный эффект на содержание жира, количество которого за третью лактацию для этого варианта превышает значения генотипов *AA* и *AB* на 17.0 и 18.7 кг соответственно ($p < 0.05$; $p < 0.01$) [42]. Dragan Nikšić и соавт. (2021), проведя исследования на коровах симментальской породы ($n = 157$), указывали на отсутствие значительной разницы в количестве молочного жира за стандартную лактацию между генотипами *BB* и *AB*, отмечая повышение этого показателя на 10 кг для обоих вариантов по сравнению с генотипом *AA*. Однако стоит отметить, что увеличение жирномолочности незначительно и составило 0.06% [23].

Другие же исследователи не обнаружили достоверной связи между качественными и количественными признаками молока и полиморфизмом *LGB* [21, 23]. Например, В. Soyudal и соавт. (2018) при обследовании чистопородных голштинских пород ($n = 189$), отобранных случайным образом из товарного стада в районе Южной Мармары, было установлено, что в зависимости от генотипа *LGB* различия в содержании молочного белка (*AA* — 3.19%, *AB* — 3.22%, *BB* — 3.24%), жира (*AA* — 3.41%, *AB* — 3.39%, *BB* — 3.33%), лактозы (*AA* — 4.88%, *AB* —

4.85%, *BB* — 4.90%) достоверно отсутствуют [21]. К такому же выводу, а именно отсутствию статистического значимого влияния того или иного генотипа *LGB* на молочную продуктивность, пришли А. Dokso и соавт. (2014), которые проводили исследование в Италии на трех породах крупного рогатого скота: голштинская ($n = 182$), симментальская ($n = 116$) и бурая ($n = 73$) [45].

Кроме рассмотренных выше традиционно учитываемых показателей молочной продуктивности, интерес исследователей представляют и некоторые другие качественные характеристики молока. Так, например, F. Cendron и соавт. (2021) в течение 10 лет (2012–2021 гг.) проводили исследование влияния полиморфных форм *LGB* на состав и коагуляционные свойства молока на голштино-фризских коровах ($n = 5316$) в стадах региона Венето в Италии. В результате авторы установили, что содержание мочевины было незначительно ниже у особей с генотипом *AA* (22.23 мг/дл), чем у *AB* (22.55 мг/дл) и *BB* (23.12 мг/дл). Также для генотипа *AA* был выявлен более низкий уровень соматических клеток (SCS) (2.91) по сравнению с вариантом *BB* (3.03) [32]. К такому же выводу пришли U. Singh с соавт. (2015), которые провели исследование на животных помесной породы Frieswal (голштино-фризская порода $\times$ Sahiwal — индийская коренная порода) ($n = 106$). В результате было установлено, что показатель SCS у животных с генотипом *LGB AA* (2.12 ± 1.63) достоверно ($p < 0.05$) ниже, чем у вариантов *AB* (3.98 ± 1.13) и *BB* (3.31 ± 1.98) [46]. Выявленная взаимосвязь, вероятно, связана с разной восприимчивостью к маститу или реакцией иммунной системы на инфекции вымени в зависимости от аллельного варианта *LGB* [32]. Однако есть данные, отрицающие достоверную связь между полиморфизмом рассматриваемого гена и показателем соматических клеток [47].

В отношении же генотипа *BB LGB* имеются данные, подтверждающие, что указанный вариант связан с увеличением содержания в молоке казеина, сухих веществ [23], а также благоприятно влияет на коагуляционные свойства молока [32].

Также стоит отметить, что при выявлении общей тенденции зависимости изменения различных параметров молочной продуктивности от полиморфных форм *LGB* стоит обратить внимание, что влияние аллелей на хозяйственно полезные признаки различно и зависит от породы крупного рогатого скота [21, 48]. Так, на основе метаанализа было установлено, что генотип *AA LGB* в среднем увеличивает удои коров голштинской (на 0.66%) и джерсейской (на 1.07%) пород по сравнению с другими аллельными вариантами ($p < 0.001$). Для симментальской и бурой швицкой пород выявлено возрастание молочной продуктивности на 1.77 и 1.05% у животных с генотипами *BB* и *AB* соответственно ($p < 0.001$) [48]. Таким образом, бы-

ло доказано, что различное влияние полиморфных вариантов *LGB* находится в некоторой зависимости от породы в соответствии с общей генетикой [21, 48].

Кроме того, даже внутри одной популяции один и тот же вариант полиморфизма определенного гена может оказывать различное воздействие на молочную продуктивность и состав молока в зависимости от генотипа самого животного. Так, для выявления связи между генами и количественными и качественными характеристиками молока было проведено обследование помесных голштинских коров. В результате было установлено, что вариант *AA LGB* оказывает положительное влияние на величину удоев, что подтверждается многими предыдущими исследованиями [16, 21, 22]. При анализе только гена гормона роста (*GH*) значимого эффекта на рассматриваемые показатели выявлено не было. Однако составной вариант по обоим указанным генам в гомозиготном состоянии (*VVAA*) оказывает наибольшее влияние на увеличение молочной продуктивности и выход молочного белка по сравнению с другими комбинациями генов. Вероятно, такой эффект достигается за счет продукта гена гормона роста, который увеличивает поступление питательных веществ из запасов тела в молочную железу, стимулируя тем самым выработку молока и повышая количество аминокислот, используемых в процессе синтеза β -LG. Таким образом, это исследование доказывает плеiotропное влияние генов и необходимость комплексного изучения их эффектов для повышения качества селекционных программ [27].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Профиль полиморфных вариантов *LGB* крупного рогатого скота вносит существенный вклад в формирование качественных и количественных характеристик молока. Наибольшей изученностью характеризуются аллели *A* и *B*, при этом частота встречаемости последней несколько выше у большинства пород и в среднем составляет 0.51–0.6%, а в отдельных случаях достигает 0.75%. Исключение составляют животные симментальской породы, для которых установлена обратная тенденция.

Результаты же исследований влияния аллелей *A* и *B* на показатели молочной продуктивности не всегда совпадают. Вероятно, это связано с условиями содержания скота, генетическими особенностями животных и изучаемой породы в целом, а также методологической базой и различными научными подходами к формированию макета исследования. Тем не менее выявление общих закономерностей влияния полиморфных вариантов *LGB* представляется возможным.

Большинство исследователей показывают рост величины удоев у животных с генотипом *AA*. Одна-

ко для симментальской породы наибольшее повышение данного показателя присуще для генотипа *AB*, что, вероятно, является видоспецифической особенностью. Кроме того, аллель *A*, согласно некоторым исследованиям, связан со снижением количества мочевины и соматических клеток (SCS) в молоке.

Повышение содержания молочного белка и жира, напротив, связано с аллелем *B*, при этом наибольшие значения этих органических веществ также установлены для гомозиготных генотипов. Также наличие аллеля *B* связывают с увеличением содержания в молоке казеина, сухих веществ, а также благоприятным влиянием на коагуляционные свойства.

Различное влияние *LGB* на показатели молочной продуктивности крупного рогатого скота в зависимости от аллеля и породы животного, т.е. его генотипа в целом, обосновывает необходимость продолжения исследований этого маркера для оценки генетической основы параметров молочной продуктивности, при этом для повышения качества селекционных программ более пристальное внимание стоит уделить комплексному изучению эффектов генов.

Работа подготовлена в рамках выполнения темы Государственного задания ФГБУН ФИЦКИА УрО РАН “Разработка системы производства полноценной и экологически безопасной продукции отрасли молочного животноводства в АЗ РФ на основе использования генотипированных племенных животных” (FUUW-2021-0005) (регистрационный номер – 121122800216-6).

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. Рачкова Е.Н. Наследуемость молочной продуктивности в зависимости от полиморфизма гена бета-лактоглобулина // Уч. зап. Казанской гос. академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2016. Т. 226. № 2. С. 209–213.
2. Милостивый Р.В., Карлова Л.В., Санжара Р.А. Качественный состав молока голштинских коров в зависимости от паратипических и генетических факторов // Наук. вісник львівського нац. університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені с.з. гжицького. 2017. Т. 19. № 82. С. 125–131. <https://doi.org/10.15421/nvlvet8226>
3. Zinnatov F.F., Zinnatova F.F., Volkov A.H. et al. Studying the association of polymorphic variants of LEP, TG5, CSN3, LGB genes with signs of dairy productivity of cattle // Intern. J. Res. Pharmaceutical Sci. 2020. V. 11.

- № 2. P. 1428–1432.
<https://doi.org/10.26452/ijrps.v11i2.2013>
4. Kolenda M., Sitkowska B., Kamola D., Lambert B.D. Composite genotypes of progesterone-associated endometrial protein gene and their association with composition and quality of dairy cattle milk // *Animal Biosci.* 2021. V. 34. № 8. P. 1283–1289.
<https://doi.org/10.5713/ab.20.0596>
 5. Bielecka M., Cichosz G., Czczot H. Antioxidant, antimicrobial and anticarcinogenic activities of bovine milk proteins and their hydrolysates – A review // *Intern. Dairy J.* 2022. V. 127. P. 1–13.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105208>
 6. Ельчанинов В.В. Номенклатура и биохимические свойства основных сывороточных белков. Бета-лактоглобулин // *Сыроделие и маслоделие.* 2009. № 2. С. 38–39.
 7. Kazimierska K., Kalinowska-Lis U. Milk proteins-their biological activities and use in cosmetics and dermatology // *Molecules.* 2021. V. 26. № 3253. P. 1–22.
<https://doi.org/10.3390/molecules26113253>
 8. Bologa M., Vrabie E., Paladii I. et al. Peculiarities of extraction of β -lactoglobulin in protein mineral concentrates at electroactivation of whey // *One Health & Risk Management.* 2021. V. 1. № 1. P. 52–68.
<https://doi.org/10.38045/ohrm.2021.1.06>
 9. Сафина Н.Ю., Гайнутдинова Э.Р., Зиннатова Ф.Ф. и др. Влияние комплексных генотипов генов каппа-казеин (CSN3) и бета-лактоглобулин (LGB) на молочную продуктивность голштинского скота // *Аграрный науч. журн.* 2020. № 5. С. 64–67.
<https://doi.org/10.28983/asj.y2020i5pp64-67>
 10. Zlotkowska D., Stachurska E., Fuc E. et al. Differences in regulatory mechanisms induced by β -lactoglobulin and κ -casein in cow's milk allergy mouse model—in vivo and ex vivo studies // *Nutrients.* 2021. V. 13. № 349. P. 1–16.
<https://doi.org/10.3390/nu13020349>
 11. McSweeney P.L.H., Fox P.F. *Advanced Dairy Chemistry. Volume 1A: Proteins: Basic Aspects*, 4th ed. Boston: Springer, 2013. 548 p.
<https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4714-6>
 12. Bosman G.P., Oliveira S., Simons P.J. et al. Limited lactosylation of beta-lactoglobulin from cow's milk exerts strong influence on antigenicity and degranulation of mast cells // *Nutrients.* 2021. V. 13. № 2041. P. 1–13.
<https://doi.org/10.3390/nu13062041>
 13. Bogahawaththa D., Chandrapala J., Vasiljevic T. Thermal denaturation of bovine β -lactoglobulin in different protein mixtures in relation to antigenicity // *Intern. Dairy J.* 2019. V. 91. P. 89–97.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.10.004>
 14. Chessa S., Nicolazzi E.L., Nicoloso L. et al. Analysis of candidate SNPs affecting milk and functional traits in the dual-purpose Italian Simmental cattle // *Livestock Sci.* 2015. V. 173. P. 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.12.015>
 15. Bohloul M., Halli K., Yin T. et al. Genome-wide associations for heat stress response suggest potential candidate genes underlying milk fatty acid composition in dairy cattle // *J. Dairy Sci.* 2022. V. 105. № 4.
<https://doi.org/10.3168/jds.2021-21152>
 16. Погорельский И.А., Позовникова М.В. Полиморфизм гена бета-лактоглобулина (BLG) в стаде крупного рогатого скота черно-пестрой породы и взаимосвязь его генотипов с показателями молочной продуктивности // *Генетика и разведение животных.* 2014. № 1. С. 45–47.
 17. Долматова И.Ю., Валитов Ф.Р. Оценка генетического потенциала крупного рогатого скота по маркерным генам // *Вестник Башкирского ун-та.* 2015. Т. 20. № 3. С. 850–853.
 18. Caroli A.M., Chessa S., Erhardt G.J. Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition // *J. Dairy Sci.* 2009. V. 92. № 11. P. 5335–5352.
<https://doi.org/10.3168/jds.2009-2461>
 19. Трубицина Т.П., Рябых В.П., Колоскова Е.М. и др. Использование гена бета-лактоглобулина при получении рекомбинантных белков – от старых технологий трансгенеза к новым методам редактирования генома (обзор) // *Проблемы биологии продуктивных животных.* 2018. № 3. С. 15–34.
<https://doi.org/10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2018.3.15-34>
 20. Ахметов Т.М., Тюлькин С.В., Зарипов О.Г. Полиморфизм гена бета-лактоглобулина в стадах крупного рогатого скота // *Уч. зап. Казанской гос. акад. ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана.* 2010. Т. 202. С. 36–41.
 21. Soyudal B., Ardicli S., Samli H. et al. Association of polymorphisms in the CSN2, CSN3, LGB and LALBA genes with milk production traits in Holstein cows raised in Turkey // *J. Hellenic Veterinary Med. Soc.* 2018. V. 69. № 8. P. 1271–1282.
<https://doi.org/10.12681/jhvms.19617>
 22. Barbosa S.B.P., de Araújo Í.I.M., Martins M.F. et al. Genetic association of variations in the kappa-casein and β -lactoglobulin genes with milk traits in girolando cattle // *Revista Brasileira de Saude e Producao Animal.* 2019. V. 20. № e0312019. P. 1–12.
<https://doi.org/10.1590/S1519-9940200312019>
 23. Nikšić D., Pantelić V., Ostojić Andrić D. et al. The influence of genetic β -lactoglobulin polymorphism on the quantity and quality of milk of the simmental breed in Serbia // *Genetika.* 2021. V. 53. № 1. P. 263–270.
<https://doi.org/10.2298/GENSR2101263N>
 24. AgReg-SNPdb: A database of regulatory SNPs for agricultural species. Режим доступа: <https://azifi.tz.agrar.uni-goettingen.de/agreg-snpdb/snps.php?page=welcome>
 25. Sanchez M.P., Fritz S., Patry C. et al. Frequencies of milk protein variants and haplotypes estimated from genotypes of more than 1 million bulls and cows of 12 French cattle breeds // *J. Dairy Sci.* 2020. V. 103. № 10. P. 9124–9141.
<https://doi.org/10.3168/jds.2020-18492>
 26. Asmaa W.Z., Ashraf A., Iman E., Khairy M.E.-B. Association of β -lactoglobulin gene polymorphism with milk yield, fat and protein in holstein-friesian cattle // *World's Veterinary J.* 2016. V. 6. № 3. P. 117–122.

27. Molee A., Poompramin C., Mernkrathoke P. Effect of casein genes – beta-LGB, DGAT1, GH, and LHR – on milk production and milk composition traits in crossbred Holsteins // *Genet. Mol. Res.* 2015. V. 14. № 1. P. 2561–2571.
<https://doi.org/10.4238/2015.March.30.15>
28. Сафина Н.Ю., Зиннатова Ф.Ф., Юльметьева Ю.Р. и др. Полиморфизм гена β-лактоглобулина (LGB) и его взаимосвязь с экономически важными признаками голштинского скота // *Зоотехния и ветеринария*. 2018. Т. 32. № 9. С. 78–80.
29. Morkūnienė K., Miceikienė I., Kerzienė S. et al. Genetic diversity of milk protein beta-lactoglobulin and association with production traits genomic values among Holstein cattle // *Indian J. Animal Sci.* 2018. V. 88. № 11. P. 1289–1293.
30. Ardici S., Samli H., Soyudal B. et al. Evaluation of candidate gene effects and environmental factors on reproductive performance of Holstein cows // *South African J. Animal Sci.* 2019. V. 49. № 2. P. 380–394.
<https://doi.org/10.4314/sajas.v49i2.17>
31. Şahin Semerci E., Balcioğlu M.S. The effects of κ-casein, β-lactoglobulin, prolactin and DGAT1 polymorphisms on milk yields in Turkish Holstein cows // *Turkish J. Veterinary and Animal Sci.* 2022. V. 46. № 1. P. 9–17.
<https://doi.org/10.3906/vet-2105-10>
32. Cendron F., Franzoi M., Penasa M. et al. Effects of β- and κ-casein, and β-lactoglobulin single and composite genotypes on milk composition and milk coagulation properties of Italian Holsteins assessed by FT-MIR // *Italian J. Animal Sci.* 2021. V. 20. № 1. P. 2243–2253.
<https://doi.org/10.1080/1828051X.2021.2011442>
33. Heidari M., Azari M.A., Hasani S. et al. Effect of polymorphic variants of GH, Pit-1, and β-LG genes on milk production of Holstein cows // *Rus. J. Genet.* 2012. V. 48. № 4. P. 417–421.
34. Kochnev N., Goncharenko G., Mager S. et al. Genotyping of selection-significant polymorphisms of cattle of the Western Siberia // *Intern. Sci. and Pract. Conf. “Development of the Agro-Industrial Complex in the Context of Robotization and Digitalization of Production in Russia and Abroad”*. 2020. V. 222. № 03019. P. 1–8.
<https://doi.org/10.1051/e3sconf/202022203019>
35. Глазко В.И., Андрейченко И.Н., Ковальчук С.Н. и др. Гены-кандидаты контроля характеристик молочной продуктивности крупного рогатого скота // *Рос. с.-х. наука*. 2016. № 5. С. 45–50.
36. Smiltina D., Grislis Z. Molecular genetic analysis of milk protein gene polymorphism of dairy cows and breeding bulls in Latvia // *Agronomy Res.* 2018. V. 16. № 3. P. 900–909.
<https://doi.org/10.15159/AR.18.084>
37. Ferreira J.B., Guilhermino M.M., Leite J.H.G.M. et al. Polymorphisms of leptin, β-lactoglobulin and pituitary transcription factor have no effect on milk characteristics in crossbred cows // *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2019. V. 71. № 2. P. 715–719.
<https://doi.org/10.1590/1678-4162-10785>
38. Ялуга В.Л., Прожерин В.П., Хабибрахманова Я.А. и др. Полиморфизм генов *CSN3*, *LGB*, *PRL*, *GH*, *LEP* у холмогорских коров // *Молочное и мясное скотоводство*. 2018. № 4. С. 5–8.
39. Neamt R., Saplaçan G., Acatincai S. et al. The influence of CSN3 and LGB polymorphisms on milk production and chemical composition in Romanian Simmental cattle // *Acta Biochimica Polonica*. 2017. V. 64. № 3. P. 493–497.
https://doi.org/10.18388/abp.2016_1454
40. Kyselova J., Ječmínková K., Matějčková J. et al. Physiochemical characteristics and fermentation ability of milk from Czech Fleckvieh cows are related to genetic polymorphisms of β-casein, κ-casein, and β-lactoglobulin // *Asian-Australasian J. Animal Sci.* 2019. V. 1. № 1. P. 14–22.
<https://doi.org/10.5713/ajas.17.0924>
41. Huang. W., Peñagaricano F., Ahmad K.R. et al. Association between milk protein gene variants and protein composition traits in dairy cattle // *J. Dairy Sci.* 2012. V. 95. № 1. P. 440–449.
<https://doi.org/10.3168/jds.2011-4757>
42. Епишко О.А., Пешко В.В., Пешко Н.Н. Использование генов *LGB*, *PRL* и *GH* в качестве маркеров молочной продуктивности в селекции крупного рогатого скота белорусской черно-пестрой породы // *Уч. зап. учреждения образования Витебская орденна “Знак почёта” гос. академия ветеринарной медицины*. 2018. Т. 54. № 2. С. 84–88.
43. Cichosz G., Czeżot H., Bielecka M. The anticarcinogenic potential of milk fat // *Annals Agricultural and Environmental Med.* 2020. V. 27. № 4. P. 512–518.
<https://doi.org/10.26444/aaem%2F116095>
44. Ганиева Е.С., Канарейкина С.Г., Хабирова Ф.А., Канарейкин В.И. Сравнительный анализ биологической и пищевой ценности молока разных сельскохозяйственных животных // *Вестник БГАУ*. 2021. № 1. С. 49–55.
<https://doi.org/10.31563/1684-7628-2021-57-1-49-55>
45. Dokso A., Ivanković A., Brka M. et al. Utjecaj genetskih varijanti β-laktoglobulina, κ-kazeina i αs1-kazei na na količinu i kvalitetu mlijeka holstein, simentalke i smeđe pasmine goveda u Hrvatskoj // *Mljekarstvo*. 2014. V. 64. № 1. P. 49–56.
46. Singh U., Deb R., Kumar S. et al. Association of prolactin and beta-lactoglobulin genes with milk production traits and somatic cell count among Indian Frieswal (HF × Sahiwal) cows // *Biomarkers and Genomic Medicine*. 2015. V. 7. № 1. P. 38–42.
<https://doi.org/10.1016/j.bgm.2014.07.001>
47. Čížek J., Brzákova M., Hanusová L. et al. Somatic cell score: Gene polymorphisms and other effects in Holstein and Simmental cows // *Animal Bioscience*. 2022. V. 35. № 1. P. 13–21.
<https://doi.org/10.5713/ab.20.0720>
48. Zepeda-Batista J.L., Saavedra-Jiménez L.A., Ruíz-Flores A. et al. Potential influence of κ-casein and β-lactoglobulin genes in genetic association studies of milk quality traits // *Asian-Australasian J. Animal Sci.* 2017. V. 30. № 12. P. 1684–1688.
<https://doi.org/10.5713/ajas.16.0481>

Association of Allelic Variants *A* and *B* of the Beta-Lactoglobulin Gene with Dairy Productivity of Cattle

E. V. Parygina^{a, b, *} and I. S. Kozhevnikova^{a, b}

^a*Laverov Federal Research Center for Comprehensive Study of the Arctic,
Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Arkhangelsk, 163069 Russia*

^b*Lomonosov Northern (Arctic) Federal University, Arkhangelsk, 163002 Russia*

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

The effectiveness of cattle selection for quantitative and qualitative traits that are of economic importance in dairy cattle breeding largely depends on the identification of the genes that control these traits, as well as their allelic polymorphism. One such gene is the gene *LGB* encoding the protein beta-lactoglobulin. The review provides brief information about the structure and biological role of this protein, gene polymorphism. An analysis of the literature data of various studies was carried out, which made it possible to identify and evaluate the effect of the two most common alleles of the gene *LGB* (*A* and *B*) on the efficiency indicators of dairy production.

Keywords: beta-lactoglobulin, *LGB*, genetic polymorphism, cattle, dairy productivity, milk protein.

**ОБЗОРНЫЕ
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ**

УДК 576.6:575.8+631.461.52

СИМБИОГЕНЕТИКА И СИМБИОГЕНЕЗ: МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ИНТЕГРАТИВНОЙ ЭВОЛЮЦИИ

© 2023 г. Н. А. Проворов^{1, *}, И. А. Тихонович^{1, 2}

¹*Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной
микробиологии, Санкт-Петербург, 196608 Россия*

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

*e-mail: provorovnik@yandex.ru

Поступила в редакцию 04.04.2022 г.

После доработки 06.06.2022 г.

Принята к публикации 02.07.2022 г.

Симбиогенетика представлена как дисциплина, предметом которой являются объединенные системы наследственности, возникающие в ходе коэволюции неродственных организмов. Изучение этих систем дополняет методологию генетического анализа подходами “генетического синтеза”, направленного на характеристику молекулярных и экологических факторов интеграции гетерологичных геномов. Хологеномы и симбиогеномы, возникающие в процессе интегративной эволюции (симбиогенеза), разделяются, как и пангеномы прокариот, на коровые и акцессорные части. В хологеноме константная по составу коровая часть представлена геномом хозяина (ядерно-цитоплазматической системой наследственности), а варибельная акцессорная часть — метагеномом микробного сообщества, ассоциированного с хозяином и выполняющего полезные для него функции. Механизмы симбиогенеза выходят за рамки представлений о факторах эволюции свободноживущих организмов и включают: а) межвидовой альтруизм, связанный с отказом симбионтов от автономного существования, а при глубокой редукции — и от способности к самостоятельному поддержанию генома; б) наследование хозяином симбионтов как “благоприобретенных” наследственных детерминант (пангенезис). Под действием этих факторов симбионты могут быть преобразованы во внутриклеточные органеллы хозяина, утратившие генетическую индивидуальность, а иногда и лишённые геномов. Симбиогенез впервые представлен нами как многоэтапный процесс, включающий возникновение: а) геном-содержащей прокариотической клетки; б) мультигеномной эукариотической клетки; в) многоклеточных эукариот как холобионтов, состоящих из организмов-хозяев и поддерживаемых ими микробных сообществ. Безгеномные органеллы, сохранившие базовые жизненные функции — размножение и обмен веществ, могут быть использованы как модели для реконструкции ранних этапов эволюции клетки, включая возникновение ее генома.

Ключевые слова: факультативные и облигатные симбиозы, симбиогенетика, симбиогенез и органеллогенез, хологеномы и симбиогеномы, естественный отбор, пангенезис, биологический альтруизм, системы наследственности открытого типа, горизонтальный и эндосимбиотический перенос генов, эволюция клетки.

DOI: 10.31857/S0016675823020091, **EDN:** KYCQSQ

Хотя основные положения симбиогенетики как самостоятельной дисциплины были сформулированы сравнительно недавно [1, 2], подходы к изучению интеграции неродственных организмов возникли уже более 100 лет назад. Они восходят к трудам А. де Бари [3], который рассматривал симбиоз как аналог полового процесса, и К.С. Мережковского [4], предложившего теорию симбиогенеза, в рамках которой были даны генетические доказательства происхождения клеточных органелл от свободноживущих бактерий. Сходство симбиоза и полового процесса подчеркивала Л. Маргулис [5], которая рассматривала их как альтернативные спо-

собы объединения геномов различных организмов. Правомерность этого подхода подчеркивает то, что и половой процесс, и симбиоз включают рекомбинацию партнеров, которая в первом случае приурочена к переходу эукариотического организма из диплофазы в гаплофазу, а во втором случае — к длительному сосуществованию партнеров, между которыми происходит горизонтальный (эндосимбиотический) перенос генов (рис. 1).

Изучение надвидовых генетических систем (НГС), которое является задачей симбиогенетики [2, 6], следует рассматривать как альтернативу

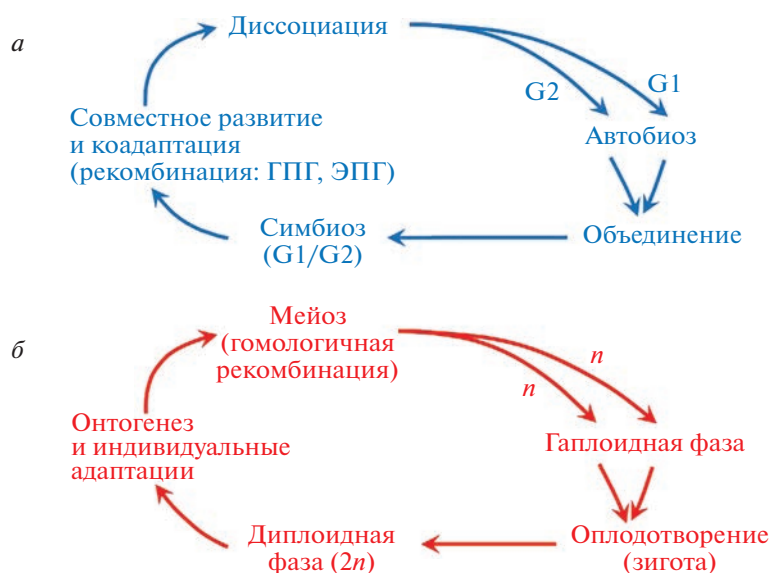


Рис. 1. Симбиоз (а) и половой процесс (б) — альтернативные способы генетической интеграции организмов ([5]; модифицировано). G1 и G2 — геномы партнеров, способных к свободному существованию (автобиозу) и к объединению в надорганизменную систему — симбиоз (G1/G2), аналогичный диплоидной фазе эукариотического организма (2n). ГПГ и ЭПГ — горизонтальный и эндосимбиотический перенос генов.

генетического анализа, направленного на разделение наследственного материала на дискретные единицы — гены и их элементы: цистроны, кодоны, мутоны, реконы [7–9]. Универсальность молекулярных механизмов поддержания и экспрессии генома, проявляемая на разных уровнях его организации, определяет объединение неродственных партнеров (бактерий и архей, прокариот и эукариот) в целостные системы — холобионты, характеризующиеся особыми механизмами индивидуального и исторического развития.

Как было показано ранее [2], в глубоко интегрированных симбиотических комплексах единицы наследственности представлены не отдельными генами, а надгенными системами, например парами генов, принадлежащих разным организмам. Развивая подход, предложенный В. Логерином [10], который считал, что симбиоз формирует собственный фенотип как совокупность отсутствующих вне взаимодействия (эмерджентных) признаков [11], мы предположили наличие у симбиоза собственного генотипа, возникающего при объединении партнеров. Он может быть представлен как продукт геномной комплементации симбионтов и хозяев [12], которые в ходе коэволюции переходят от временных ассоциаций к стабильному сосуществованию. При этом функциональная интеграция, основанная на сигнальных и метаболических взаимодействиях партнеров, переходит в их структурную интеграцию, которая основана на рекомбинации и может приводить к преобразованию НГС в функ-

ционально целостный, но мозаичный по составу геном симбиотически возникшего организма.

К настоящему времени подробно изучены молекулярные основы лишь одного из этапов симбиогенеза, связанного с формированием мультигеномной эукариотической клетки. В нашей статье будет показано, что симбиогенез включает также возникновение: а) геном-содержащей прокариотической клетки; б) многоклеточных эукариот как холобионтов, состоящих из многоклеточных хозяев и поддерживаемых ими микробных сообществ. Преемственность различных этапов симбиогенеза проявляется в ходе преобразования временных органелл эукариотической клетки в ее постоянные органеллы: для первых характерна утрата биологической индивидуальности (способности к автономному существованию), для вторых — утрата генетической индивидуальности (способности к самостоятельному поддержанию и экспрессии генома).

НАДВИДОВЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ

Для обозначения возникающих при симбиозе НГС широко используется понятие “хологеном”, под которым понимают совокупность всех генов, имеющихся у макроорганизма-хозяина и ассоциированного с ним микробного сообщества [13]. Однако этот термин требует уточнения, поскольку отношения в биосистемах, образуемых эукариотами и их микробными партнерами, широко варьируют — от малоспецифичных факультативных

ассоциаций до строго облигатных, вертикально передаваемых внутриклеточных симбиозов.

Для характеристики временно формируемых НГС мы предложили понятие “симбиогеном”, который состоит из функционально сопряженных генов, контролирующих отношения партнеров [2]. В N_2 -фиксирующем бобово-ризобийном симбиозе (БРС) симбиогеном включает гены, которые определяют: а) узнавание партнеров и развитие клубеньков — бактериальные *nod*-гены синтеза сигнальных липо-хито-олигосахаридных Nod-факторов и растительные *NFR*-гены для их рецепции; б) метаболическую интеграцию партнеров — бактериальные *nif/fix*-гены синтеза нитрогеназы и растительные гены *GS/GOGAT/AAT* для ассимиляции продуктов N_2 -фиксации [14]. Коэволюция партнеров по этим генам, выявляемая на популяционном и филогенетическом уровнях [15–17], обычно сопровождается сужением специфичности симбиоза и повышением его экологической эффективности. В эволюционной перспективе данные процессы могут приводить к преобразованию временно возникающих симбиогеномов в облигатные хологеномы: стабильное сосуществование партнеров предполагает участие во взаимодействии всех имеющихся у них генов.

Объединенные системы наследственности, формируемые на основе геномов хозяев и метагеномов ассоциированных с ними микробных сообществ, эволюционируют по схеме: симбиогеном → хологеном → мозаичный геном хозяина. По мере прохождения этого пути возрастает целостность НГС, которая на первых этапах коэволюции носит функциональный характер: несмотря на цитологическое разобщение геномов партнеров, их гены работают столь же согласованно, как гены унитарного организма [14]. Переход к структурной целостности НГС связан со спорадически происходящим горизонтальным переносом генов (ГПГ), который при трансформации симбионтов в органеллы принимает форму массивированного эндосимбиотического переноса их генов в хромосомы хозяев. Важнейшая предпосылка этой трансформации — вертикальная передача симбионтов при размножении хозяев, знаменующая преобразование НГС в систему наследования, которое вызывает существенное возрастание целостности холобионта.

Переход факультативных симбионтов в строго облигатные, вертикально передаваемые формы правомерно рассматривать как проявление пангенезиса — наследования адаптивных признаков, приобретаемых хозяевами в ходе индивидуального развития [14]. В лабораторных условиях эта эволюция может быть ускорена: обработка тлей, из которых изгнаны облигатные симбионты *Buchnera*

(продуценты незаменимых аминокислот), родственными им свободноживущими энтеробактериями *Serratia* привела к вселению последних в освободившиеся внутриклеточные ниши и к вертикальной передаче хозяевами вновь приобретенных эндосимбионтов [18].

Объединение партнеров симбиоза для совместной адаптации к внешней среде сопровождается их частичным, а иногда и полным отказом от биологической и генетической индивидуальности. Биологическая индивидуальность, определяемая способностью к автономному развитию и размножению, может быть ограничена уже у факультативных симбионтов, характеризующихся глубокой специализацией к хозяевам. Примерами этих ограничений являются утрата фототрофности первичными ризобиями (*Bradyrhizobium*), которые возникли из свободноживущих азотфиксаторов *Rhodospseudomonas* [19, 20], а также утрата вторичными ризобиями (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*), возникшими при переносе *sym*-генов в различные почвенные микроорганизмы, негативных регуляторов симбиоза, определяющих выживание бактерий вне растений [21].

Ярким примером утраты биологической индивидуальности является образование симбионтами неспособных к размножению клеточных форм, проявляющих полезные для хозяев признаки. Примерами такой “альтруистической” дифференцировки являются N_2 -фиксирующие бактериоиды ризобий [22] и множественные гетероцисты *Nostoc* [23]. Их эволюция сопровождается усложнением микробных геномов — увеличением их размеров и переходом в многокомпонентные формы, которые следует рассматривать как проявление прогрессивной эволюции прокариот.

Симбиогенез как интегративная эволюция, определяемая объединением систем наследственности партнеров, является наряду с ГПГ эффективным способом преодоления дефицита генов, которое необходимо для адаптации организмов к меняющимся условиям среды. В процессе симбиогенной эволюции число генов возросло от 2000–12000 у свободноживущих прокариот до 6500–75000 у эукариот. Однако это возрастание не решило проблему дефицита генов, поскольку: а) геномы эукариот “закрыты” для регулярного пополнения новым наследственным материалом; б) гены многих адаптивно важных функций (например, N_2 -фиксации) оказались исключенными из геномов эукариот. Хотя в литературе описан ряд примеров ГПГ у эукариот, его эволюционные последствия ограничены: анализ 497 видов позволил выявить лишь 1138 генов, которые могли появиться в ядерных хромосомах в результате ГПГ

Таблица 1. Системы наследственности открытого типа (СНОТ)

Свойства СНОТ	Типы СНОТ	
	пангеномы	хологеномы, симбиогеномы
Обладатели СНОТ	Прокариоты*	Эукариоты
Коровая, константная по составу часть	Гены домашнего хозяйства	Ядерно-цитоплазматические системы наследственности
Доля коровой части в СНОТ	Обычно более 10%	Обычно менее 1%
Акцессорная, изменчивая по составу часть	Гены, определяющие адаптивные функции, включая образование симбиозов	Метагеномы микробных сообществ, поддерживаемых хозяевами
Способы пополнения СНОТ новыми генами (его последствия)	Горизонтальный перенос генов (увеличение геномов, иногда их переход в многокомпонентные формы)	Получение из внешней среды симбионтов – носителей новых функций (приобретение хозяином способности к узнаванию симбионтов и их хостингу во внутри- и межклеточных компартментах)

* Пангеномы некоторых видов, например генетически редуцированных симбионтов эукариот, относят к закрытому типу (акцессорная часть составляет менее 10% генома).

[24]. Поэтому для расширения своего адаптивного потенциала эукариоты формируют симбиогеномы и хологеномы как системы открытого типа, которые могут оперативно пополняться новыми генами в процессе адаптивной эволюции, а также и в ходе онтогенеза (табл. 1).

У прокариот преодоление генного дефицита происходит благодаря расширению пангеномов, в которые путем ГПГ рекрутируются новые гены (их источники – другие члены биоценоза, либо внеклеточная ДНК), включаемые в акцессорную часть генома. В хологеноме акцессорная часть представлена метагеномом симбиотического микробного сообщества, а роль коровой части играет ядерно-цитоплазматическая система наследственности хозяина. Использование им адаптивных функций симбионтов не требует структурной интеграции геномов партнеров: эти функции приобретаются путем образования партнерами общих сигнально-рецепторных комплексов и метаболических путей.

Факторы симбиогенеза

Утрата симбиотическими организмами биологической и генетической индивидуальности не может получить объяснения в рамках общепринятых представлений об адаптивной эволюции свободноживущих организмов, направляемой естественным (индивидуальным) отбором. На это указывал еще Ч. Дарвин [25], который считал, что отбор не закрепляет у организмов признаки, полезные для партнеров по взаимодействию, но бесполезные и тем более неблагоприятные для своих непо-

средственных обладателей. Развивая эти взгляды, Дж. Майнард Смит [26] предположил, что польза или вред, которые организм приносит партнеру по симбиозу, представляют собой побочные эффекты индивидуальных адаптаций. Однако А. де Бари [3], Б.М. Козо-Полянский [27], Ф.Г. Добжанский [28] и Л. Маргулис [5] полагали, что основным фактором эволюции симбиотических отношений является именно естественный отбор. С этим согласуются результаты изучения популяционной генетики симбиотических микроорганизмов, которые показали, что в их эволюции действуют разнообразные селективные факторы, которые существенно отличаются от индивидуального (Дарвиновского) отбора.

Известно, что индивидуальный отбор является основным механизмом эволюции паразитарных отношений, который в системах “ген–на–ген” часто проявляется в форме частотно-зависимого отбора (ЧЗО) [29]. Этот фактор участвует также и в эволюции мутуализма: действуя наряду с дизруптивным отбором, ЧЗО способствует поддержанию в популяциях ризобий N_2 -фиксирующих генотипов [15, 30]. Однако большинство видов ризобий не использует этот признак вне хозяина, в связи с чем механизмы эволюции этих бактерий на повышение симбиотической активности остаются неясными.

Моделирование эволюции ризобий показало, что повышение встречаемости в их популяциях активных N_2 -фиксаторов обеспечивает межгрупповой отбор, единицами которого являются группы клеток, находящиеся в разных особях расте-

ния-хозяина, либо в разных клубеньках одного растения [14]. Этот отбор связан с механизмом инфицирования растений – примитивным смешанным (через разрывы эпидермиса), либо возникшим на его основе клональным (через корневые волоски) [31]. В последнем случае предпочтительное размножение активно фиксирующих N_2 генотипов ризобий может происходить путем: 1) их направленного отбора хозяином из полиморфных почвенных популяций; 2) повышения численности N_2 -фиксирующих внутриклубеньковых групп, сформировавшихся при развитии симбиоза.

К настоящему времени подтвержденным можно считать второй механизм, основанный на положительных обратных связях партнеров. Оказалось, что в безазотной атмосфере (80% Ar + 20% O_2), блокирующей нитрогеназную активность, клубеньки получают гораздо меньше С-соединений, чем в присутствии N_2 [32]. Таким образом, преимущественное размножение активно фиксирующих N_2 бактериальных генотипов обеспечивает хозяин путем активного снабжения углеродом клубеньков, образованных этими генотипами.

Использование экспериментальных и математических моделей показало, что необратимая дифференцировка бактериоидов, происходящая в клубеньках ряда бобовых, может быть представлена как проявление альтруизма, поддерживаемого в популяциях ризобий родственным отбором. При этом отмирание бактериоидов, связанное с обновлением N_2 -фиксирующей зоны клубенька, с избытком компенсируется размножением изогенных бактериоидов недифференцированных бактерий, которые используют поступающие в клубеньки С-соединения [14]. Важно отметить, что в контроле альтруизма участвуют не только симбионты, но и растения-хозяева, у которых выявлен ряд генов, определяющих дифференцировку бактериоидов [12]. Таким образом, хозяин играет роль посредника в передаче альтруистических эффектов между членами микробной популяции. Это посредничество компенсируется получением растениями азота, показывая, что отношения партнеров симбиоза могут быть квалифицированы как межвидовой альтруизм [33].

Описанная стратегия симбиоза получает развитие на поздних этапах его эволюции: при переходе симбионтов к облигатной зависимости от хозяев между ними устанавливаются отношения “принудительного альтруизма”, необходимого для выживания обоих партнеров [34]. Наблюдаемая при этом геномная редукция бактерий представляет собой закономерный процесс: на ее начальных этапах элиминируются гены, контролирующие метаболизм и

развитие клетки, а на поздних этапах – гены, ответственные за поддержание и экспрессию генома.

Выполнение хозяином роли организатора эволюции микропартнеров связано с тем, что он и сам является объектом отбора на повышение симбиотической активности. В системе БРС результатом этого отбора является формирование клеточных компартментов (инфекционных нитей, симбиосом), содержащих эндосимбиотические популяции ризобий и обеспечивающих максимально полное проявление ими признаков мутуализма [31]. Таким образом, при симбиозе объектами отбора являются не отдельно взятые растения или бактерии, а надорганизменные комплексы – холобионты, повышение продуктивности которых выгодно для обоих партнеров.

Итак, становление симбиотических отношений – это результат коэволюции партнеров, являющейся результатом тесного взаимодействия их популяций: изменения их структуры у одного из партнеров вызывают комплементарные изменения в популяции другого партнера [35]. В системе БРС результатом их коэволюции является филогенетическая конгруэнтность генов, кодирующих LysM-рецепторы растений, и бактериальных генов синтеза Nod-факторов, узнаваемых этими рецепторами [16]. Однако эта конгруэнтность ограничена популяционными отношениями: при изучении надвидовых таксонов, представляющих разные группы перекрестной инокуляции, она обычно не выявляется в связи с переключением симбионтов на новых хозяев [36]. Наиболее изучена филогенетическая конгруэнтность партнеров в облигатных симбиозах, образуемых насекомыми с генетически редуцированными бактериями (например, *Buchnera*), которые передаются вертикально при размножении хозяев [37].

ЭВОЛЮЦИЯ КЛЕТОЧНОГО ГЕНОМА

Развитие симбиогенетики открывает широкие возможности для решения ряда общебиологических проблем, включая возникновение клетки и ее генома. Используемые для этого подходы основаны на предположении о том, что в ходе редуccionной эволюции бактерий, приводящей к их преобразованию в клеточные органеллы, наиболее высокую стабильность проявляют древние генные системы, тогда как недавно возникшие системы подвергаются быстрой утрате. Известно, что на первых этапах редуccionной эволюции происходила утрата бактериями “операционных” и лишь затем “информационных” генов [38], показывая, что репликация и экспрессия генома (матричные процессы) являются более древними

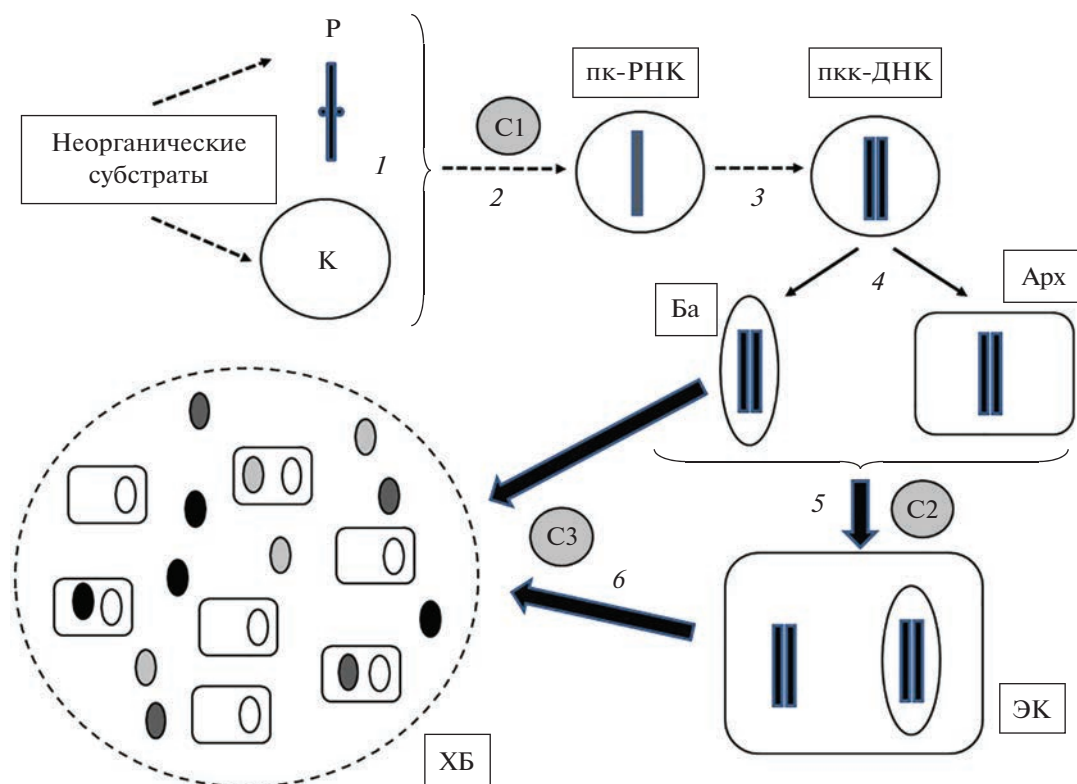


Рис. 2. Симбиогенная эволюция клеточных организмов. Стрелками обозначены эволюционные процессы: гипотетические (пунктирные), эмпирически доказанные (сплошные тонкие) и экспериментально изученные (жирные). 1 – возникновение предбиологических форм – коацерватных капель (К) (“гигантских везикул” [40]) и рибозимов (Р); 2 – возникновение протоклеток с РНК-геномами (пк-РНК); 3 – возникновение прокариотических клеток с ДНК-геномами (пкк-ДНК); 4 – дивергенция пакк-ДНК с образованием бактерий (Ба) и археот (Арх); 5 – возникновение мультигеномных эукариотических клеток (ЭК); 6 – образование холобионтов (ХБ) – многоклеточных эукариот, содержащих в дополнение к постоянным органеллам (белые овалы) разнообразные симбиотические Ба (серые и черные овалы), в том числе способные к стабильному поддержанию в клетках хозяев в качестве их временных органелл. С1, С2, С3 – процессы симбиогенеза (комментарии в тексте).

его функциями, чем контроль клеточного метаболизма (ступенчатых процессов). При этом гены репликации, транскрипции, репарации и рекомбинации утрачивались раньше, чем гены трансляции, указывая на более позднее возникновение ДНК-зависимых матричных процессов по сравнению с РНК-зависимыми процессами [14]. Такой порядок утраты матричных процессов указывает на то, что древнейшие клеточные организмы имели РНК-геномы, на основе которых возникли ДНК-геномы современных организмов [38].

Продуктами наиболее поздних этапов симбиогенеза являются безгеномные органеллы, сохранившие базовые жизненные функции – обмен веществ и размножение. Это позволяет предположить, что анцестральные клеточные формы были лишены собственных геномов. Сборка геном-содержащей протоклетки может быть осуществлена в лабораторных условиях путем интродукции молекул ДНК или РНК в абиогенно возникшие, способные к репродукции “гигантские везикулы” –

коацерватные капли, окруженные билипидными мембранами [39, 40]. Оказалось, что у полученных при этом протоклеток скорость размножения выше, чем у их предшественников, указывая на участие естественного отбора в возникновении геном-содержащих клеток [40].

Полученные данные позволяют предположить, что эволюция клетки прошла ряд этапов, на которых осуществлялись симбиогенные (интегративные) процессы (рис. 2): а) включение РНК-содержащих надмолекулярных комплексов (например, рибозимов) в “гигантские везикулы” с образованием протоклеток – предшественников прокариот, имевших РНК-геномы; б) возникновение эукариотических клеток путем объединения прокариот (бактерий и археот), которые имеют ДНК-геномы, возникшие на основе РНК-геномов; в) формирование холобионтов, обусловленное переходом эукариот к многоклеточности, которая обеспечивает хостинг микроорганизмов – доноров адаптивно значимых функций.

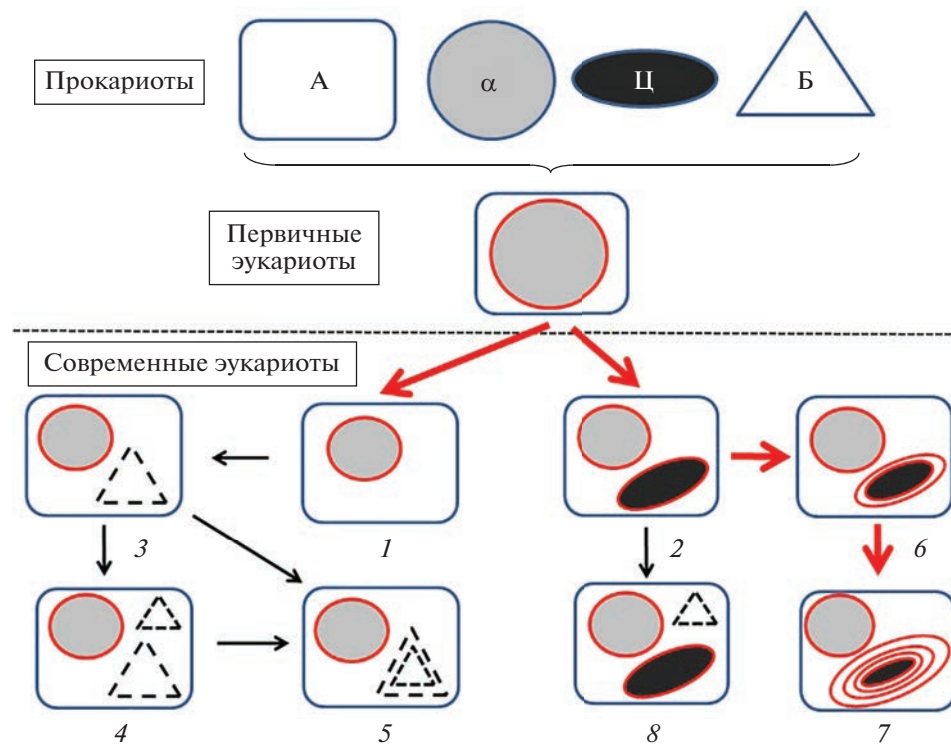


Рис. 3. Эволюция постоянных и временных клеточных органелл. А: археоты — предполагаемые хозяева бактерий, предков органелл; α: α-протеобактерии, предки митохондрий; Ц: цианобактерии, предки пластид; Б: бактерии (представители α-, β- и γ-групп протеобактерий, а также цианобактерии), предки временных органелл. Первичные эукариоты дали начало содержащему митохондрии домену Unikonta, включающему животных, грибы и амёбы (1), а также содержащему митохондрии и пластиды домену Plantae, включающему водоросли (зеленые, красные, гаптофитовые) и наземные растения (2); 3 — гетеротрофы, которые приобрели временные органеллы и способны включать дополнительные внутриклеточные симбионты в соответствии со сценариями мозаики (4) или матрешки (5). Эволюция фототрофов включала возникновение вторичных пластид (6), предками которых были одноклеточные зеленые водоросли (выявлены у некоторых представителей супергрупп Excavata и Rhizaria), либо красные водоросли (у большинства представителей супергруппы Alveolata, в которой выявлены также и третичные пластиды (7)). Некоторые цветковые растения образуют временные N₂-фиксирующие органеллы (8), возникшие на основе ризобий или актиномицетов *Frankia* (бобовые и другие представители клады Rosid 1), либо цианобактерий *Nostoc* (*Gunnera*). Жирными стрелками показано формирование постоянных органелл (присутствуют во всех клетках эукариот-хозяев), тонкими стрелками — формирование временных органелл (облигатные или факультативные эндоситобионты, присутствующие лишь в некоторых клетках хозяев; обозначены пунктирным контуром).

Интересно отметить, что более 100 лет назад К.С. Мережковский выдвинул гипотезу о происхождении ядерных хромосом из свободноживущих бактерий [4], которая коррелируется с данными о возникновении клетки путем включения молекул ДНК или РНК в “гигантские везикулы” [39, 40]. Однако признание симбиогенной природы клеточного генома оставляет без ответа вопрос о том, каким образом геном приобрел функции контроля над развитием и метаболизмом возникшей независимо от него “гигантской везикулы”. Дискуссионной остается и природа внутриклеточных мембранных структур эукариот, в первую очередь ядерных мембран и эндоплазматического ретикулума. По мнению ряда авторов, они имеют симбиогенную природу и возникли из

везикул, образуемых бактериальными по происхождению мембранами митохондрий [41].

Наиболее изученным этапом симбиогенной эволюции эукариот является возникновение клеточных органелл, которые можно разделить на постоянные (пластиды, митохондрии и их производные) и временные (рис. 3). Временными органеллами следует считать эндоситобионтов животных и растений, эволюция которых часто связана с формированием программ развития специальных тканей и органов, обеспечивающих хостинг микрочастичек и эффективное выполнение ими симбиотических функций (клубеньки бобовых, листовые железы *Gunnera*, бактериомы тлей). Наиболее разнообразны временные органеллы у насекомых, для которых характерна способность к вертикальной (трансовариальной, трансэмбриональ-

Таблица 2. Основные этапы симбиогенной эволюции эукариот, связанной с формированием постоянных и временных клеточных органелл

Этапы	Компартменты, содержащие симбионтов	Функции симбионтов	Приобретаемые хозяевами адаптивные свойства	Генетические последствия
Возникновение мультигеномной клеточной организации	Постоянные органеллы	Синтез АТФ (митохондрии), фотосинтез (пластиды)	Аэробность и дыхание (митохондрии), автотрофность (пластиды)	Формирование ядерно-цитоплазматических систем наследственности закрытого типа
Становление многоклеточности и формирование холобионтов	Межклеточные пространства, внутренние полости, проводящие сосуды, а также симбиомы (временные органеллы)	Усвоение малодоступных источников питания (N_2 , нерастворимые фосфаты, биополимеры), подавление антагонистов (антибиоз, индукция защитных реакций), гормональная регуляция развития хозяев	Освоение бедных органикой ниш, переход на новые источники питания, устойчивость к стрессам	Образование симбиогеномов и хологеномов – систем наследственности открытого типа
Развитие симбиотически специализированных тканей и органов		Фиксация CO_2 или (и) N_2 , синтез витаминов или незаменимых аминокислот (симбионты животных), либо особых питательных веществ – опинов (симбионты растений)	Метаболическая самодостаточность, необходимая, например, при пищевой специализации	Вертикальная передача эндосимбионтов как детерминант, приобретенных хозяевами из внешней среды (пангенезис)

Таблица 3. Соотношение различных по происхождению генов в геномах эукариот [41]

Группы эукариот	Доля (%) генов, полученных от	
	археот	бактерий
Все эукариоты	44	56
Эукариоты без пластид	47	53
Эукариоты с пластидами	39	61
Наземные растения	33	67
Животные, грибы (Opisthoconta)	46	54
Облигатные внутриклеточные паразиты	62	38

ной) передаче внутриклеточных симбионтов [42]. У растений образование временных органелл ограничено факультативными симбиозами с N_2 -фиксирующими ризобиями или цианобактериями, которые не передаются при размножении хозяев.

Таким образом, сравнительный анализ постоянных и временных клеточных органелл позволяет рассматривать эволюцию эукариот как процесс последовательного усложнения симбиогенных форм, которое привело к возникновению не только мультигеномных клеток, но и многоклеточных организмов как холобионтов, широкие адаптивные возможности которых обеспечивают сообществом симбиотических микробов (табл. 2). Итогом этой эволюции стало формирование мозаичных геномов эукариот, которые состоят из генов бактерий и археот, а затем и хологеномов, которые объединяют системы наследственности эукариот-хозяев и поддерживаемых ими микробных сообществ. В геноме эукариот бактериальные по происхождению гены кодируют в основном клеточный метаболизм, а гены археот – матричные процессы [41]. У большинства эукариот число бактериальных генов больше, чем число археотных генов (табл. 3). Например, у растений, имеющих два типа постоянных органелл (митохондрии и пластиды), бак-

щества симбиотических микробов (табл. 2). Итогом этой эволюции стало формирование мозаичных геномов эукариот, которые состоят из генов бактерий и археот, а затем и хологеномов, которые объединяют системы наследственности эукариот-хозяев и поддерживаемых ими микробных сообществ. В геноме эукариот бактериальные по происхождению гены кодируют в основном клеточный метаболизм, а гены археот – матричные процессы [41]. У большинства эукариот число бактериальных генов больше, чем число археотных генов (табл. 3). Например, у растений, имеющих два типа постоянных органелл (митохондрии и пластиды), бак-

териальные гены составляют 67% генома, тогда как для группы Opisthokonta (животные, грибы), имеющей только митохондрии, эта величина равна 54%. Исключениями являются генетически редуцированные облигатные паразиты: у них утрате подвергаются в основном бактериальные по происхождению гены, контролирующие метаболизм и развитие клетки, которые составляют в среднем 38% генома (у *Encephalitozoon intestinalis* — менее 15%). Важно отметить, что выявляемые в хромосомах бактериальные гены были получены эукариотами как от предков органелл, так и от неродственных им организмов, например используемых хозяевами в пищу [43].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Активное развитие симбиогенетики определяется растущим интересом к межвидовым отношениям, играющим ключевую роль в эволюции большинства организмов. Симбиогенетика тесно связана с теорией симбиогенеза, которая восходит к трудам А.С. Фаминцына (профессор С.-Петербургского университета в 1872–1889 гг.), впервые показавшего совместно с О.В. Баранецким [44] симбиотическую природу лишайников. Предпринятые позднее А.С. Фаминцыным попытки культивирования хлоропластов *Vaucheria* не были успешными [45], однако они стимулировали создание К.С. Мережковским [4] (студент С.-Петербургского университета в 1875–1880 гг.) гипотезы о возникновении хлоропластов из цианобактерий, которая легла в основу теории симбиогенеза [46]. Разделяя эти взгляды, Л. Маргулис и Д. Саган рассматривали симбиогенетику как раздел эволюционной биологии, изучающий процессы объединения неродственных организмов [47].

Рассматривая основные положения симбиогенетики, важно подчеркнуть, что она не является синонимом генетики симбиоза, так как предмет симбиогенетики — надвидовые генетические системы — выходит за рамки используемых ею экспериментальных моделей. Это отличает симбиогенетику от частных разделов науки о наследственности, например от генетики фотосинтеза или азотфиксации, при изучении которых мы не говорим о “фотогенетике” или “азотогенетике”.

Не вызывает сомнений тесная связь симбиогенетики с экологической генетикой [48], поскольку объединение неродственных организмов является ключевой стратегией эволюции, определяющей возникновение новых форм жизни и осуществляемых ими биотических отношений. Однако симбиогенетику не следует считать лишь частным разделом экологической генетики, так как моле-

кулярные механизмы и эволюционные последствия межвидовой интеграции выходят далеко за рамки воздействий, оказываемых на генетические процессы внешней средой. Еще более тесно симбиогенетика связана с системной биологией, которая изучает “эмерджентные признаки”, возникающие при образовании биосистем, в том числе — при объединении неродственных видов [11].

С точки зрения эволюционной геномики симбиоз следует рассматривать как стратегию формирования систем наследственности открытого типа, обеспечивающих высокий адаптивный потенциал партнеров (табл. 1) [49]. При этом необходимо подчеркнуть, что симбиоз более универсален, чем автономное существование организмов: он явился ключевым фактором возникновения эукариот, собственные геномы которых (ядерно-цитоплазматические системы наследственности) весьма ограничены для включения гетерологичного наследственного материала. Пангеномы эукариот, выявляемые путем анализа видовых генофондов [50], отражают варьирование аллельного состава генов и относятся к закрытому типу, в образовании которого ГПГ не принимает значительного участия. Это ставит эукариоты перед необходимостью кооперации с микроорганизмами, которые предоставляют хозяевам разнообразные адаптивные функции. Для большинства прокариот, образующих пангеномы открытого типа, симбиозы не являются обязательными, хотя способность к их формированию выявлена у широкого круга бактерий и у некоторых археот.

Важно отметить, что эукариоты, образуя хологеномы, вовлекают в свою адаптивную эволюцию значительно большие объемы чужеродного наследственного материала, чем образующие пангеномы прокариоты (табл. 1). Очевидно, что стратегия построения хологенома, реализуемая при симбиозе, открывает перед организмами гораздо более широкие экологические возможности, чем основанная на ГПГ стратегия пангенома.

Развитие предложенной более 100 лет назад теории симбиотического происхождения органелл [4] показало, что симбиогенез как процесс генетической интеграции неродственных организмов является универсальным механизмом эволюции, действующим на многих ее этапах. Они включают возникновение: а) геном-содержащей прокариотической клетки (объединение абиогенно возникших предбиологических форм — коацерватных капель и молекул нуклеиновых кислот); б) мультигеномной эукариотической клетки (преобразование генетически редуцированных облигатных симбионтов в органеллы клетки-хозяина); в) многоклеточных эукариот как холобион-

тов — стабильных надвидовых комплексов, состоящих из организмов-хозяев и поддерживаемых ими микробных сообществ. Таким образом, симбиогенез, позволяющий объединять адаптивные возможности неродственных организмов, следует считать ключевым фактором органической эволюции, обеспечивающим возникновение новых форм жизни и осуществляемых ими экологических отношений.

Анализ популяционно-генетических факторов симбиогенеза показал, что многие из них выходят за рамки синтетической теории эволюции, включая наряду с естественным отбором ряд “не-Дарвиновских” механизмов, в том числе межвидовой альтруизм и пангенезис или наследование приобретенных признаков. В эволюции симбиотических микроорганизмов эти факторы сочетаются с различными формами отбора, действующего со стороны хозяев, которые выполняют роль “селекционеров”, а возможно и “генных инженеров”, создающих полезные для себя формы симбионтов.

Работа поддержана РНФ, грант 19-16-00081П.

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. Тихонович И.А., Проворов Н.А. Симбиогенетика микробно-растительных взаимодействий // Экол. генетика. 2003. Т. 1. № 0. С. 36–46.
2. Тихонович И.А., Проворов Н.А. Развитие подходов симбиогенетики для изучения изменчивости и наследственности надвидовых систем // Генетика. 2012. Т. 48. № 4. С. 437–450.
<https://doi.org/10.1134/S1022795412040126>
3. de Bary A. Die Erscheinung der Symbiose. Strassburg: Verlag Von K.J. Trübner, 1879. 30 s.
4. Мережковский К.С. Теория двух плазм как основа симбиогенеза, нового учения о происхождении организмов. Казань: Типо-литография Имп. ун-та, 1909. 102 с.
5. Маргулис Л. Роль симбиоза в эволюции клетки. М.: Мир, 1983. 352 с.
6. Tikhonovich I.A., Provorov N.A. From plant-microbe interactions to symbiogenetics: a universal paradigm for the inter-species genetic integration // Ann. Appl. Biol. 2009. V. 154. № 3. P. 341–350.
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2008.00306.x>
7. Лобашев М.Е. Генетика. Л.: Изд-во ЛГУ, 1967. 751 с.
8. Benzer S. The elementary units of heredity // The Chemical Basis of Heredity / Eds McElroy W.D., Glass B. Baltimore, Maryland: Johns Hopkins Press, 1957. P. 70–93.
9. Инге-Вечтомов С.Г. Введение в молекулярную генетику. М.: Высш. шк., 1983. 343 с.
10. Loegering W.Q. Current concepts of inter-organismal genetics // Annu. Rev. Phytopathol. 1978. V. 16. P. 309–320.
11. von Bertalanffy L. General System Theory: Foundations, Development, Applications. N.Y.: George Braziller, 1968. 250 p.
12. Тихонович И.А., Андронов Е.Е., Борисов А.Ю. и др. Принцип дополнительности геномов в расширении адаптационного потенциала растений // Генетика. 2015. Т. 51. № 9. С. 973–990.
<https://doi.org/10.1134/S1022795415090124>
13. Rosenberg E., Zilber-Rosenberg I. The hologenome concept of evolution after 10 years // Microbiome. 2018. V. 6. № 78.
<https://doi.org/10.1186/s40168-018-0457-9>
14. Проворов Н.А., Тихонович И.А., Воробьев Н.И. Симбиоз и симбиогенез. С.-Петербург: Информ-Навигатор, 2018. 464 с.
15. Андронов Е.Е., Иголкина А.А., Кимеклис А.К. и др. Характеристика естественного отбора в популяциях клубеньковых бактерий (*Rhizobium leguminosarum*), взаимодействующих с различными видами растений-хозяев // Генетика. 2015. Т. 51. № 10. С. 1108–1116.
<https://doi.org/10.1134/S1022795415100026>
16. Igolkina A.A., Bazykin G.A., Chizhevskaya E.P. et al. Matching population diversity of rhizobial *nodA* and *legume NFR5* genes in plant-microbe symbiosis // Ecol. Evol. 2019. V. 9. № 18. P. 10377–10386.
<https://doi.org/10.1002/ece3.5556>
17. Shatskaya N.V., Bogdanova V.S., Kosterin O.E. et al. Plastid and mitochondrial genomes of *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed. and phylogeny of related legume genera // Vavilov J. Genet. Breed. 2019. V. 23. № 8. P. 972–980.
<https://doi.org/10.18699/VJ19.574>
18. Koga R., Tsuchida T., Fukatsu T. Changing partners in an obligate symbiosis: A facultative endosymbiont can compensate for loss of the essential endosymbiont *Buchnera* in an aphid // Proc. R. Soc. Lond. B. 2003. V. 270. P. 2543–2550.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2537>
19. Oda Y., Larimer F.W., Chain P.S. et al. Multiple genome sequences reveal adaptations of a phototrophic bacterium to sediment microenvironments // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. № 47. P. 18543–18548.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0809160105>
20. Rey F., Harwood C.S. FixK, a global regulator of microaerobic growth, controls photosynthesis in *Rhodospseudomonas palustris* // Mol. Microbiol. 2010. V. 75. № 6. P. 1007–1020.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.07037.x>
21. Проворов Н.А., Онищук О.П., Юргель С.Н. и др. Конструирование высокоэффективных симбиотических штаммов бактерий: эволюционные модели и

- генетические подходы // Генетика. 2014. Т. 50. № 11. С. 1273–1285.
<https://doi.org/10.7868/S0016675814110113>
22. *Haag A.F., Arnold M.F., Myka K.K. et al.* Molecular insights into bacteroid development during *Rhizobium*-legume symbiosis // *FEMS Microbiol. Rev.* 2013. V. 37. № 3. P. 364–383.
<https://doi.org/10.1111/1574-6976.12003>
23. *Kumar K., Mella-Herrera R.A., Golden J.W.* Cyanobacterial heterocysts // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* 2010. V. 2. № 4. a000315.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000315>
24. *Katz L.A.* Recent events dominate interdomain lateral gene transfers between prokaryotes and eukaryotes and, with the exception of endosymbiotic gene transfers, few ancient transfer events persist // *Philos. Transact. Roy. Soc. Lond. Ser. B. Biol. Sci.* 2015. V. 370. № 1678. 20140324.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0324>
25. *Дарвин Ч.* Происхождение видов путем естественного отбора. СПб.: Наука, 1991. 539 с.
26. *Maynard Smith J.* Generating novelty by symbiosis // *Nature.* 1989. V. 341. № 6240. P. 284–285.
27. *Козо-Полянский Б.М.* Новый принцип биологии. Очерк теории симбиогенеза. М.: Пучина, 1924. 156 с.
28. *Dobzhansky Th.* Genetics of the Evolutionary Process. N.Y.: Columbia Univ. Press, 1970. 259 p.
29. *Jones J.D.G., Dangl J.L.* The plant immune system // *Nature.* 2006. V. 444. № 7117. P. 323–329.
<https://doi.org/10.1038/nature05286>
30. *Онищук О.П., Воробьев Н.И., Проворов Н.А.* Нодуляционная конкурентоспособность клубеньковых бактерий: генетический контроль и адаптивное значение // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2017. Т. 53. № 2. С. 127–135.
<https://doi.org/10.7868/S0555109917020131>
31. *Sprent J.I.* Nodulation in Legumes. Kew Royal Botanical Gardens: Cromwell Press Ltd, 2001. 102 p.
32. *Denison R.F., Kiers E.T.* Lifestyle alternatives for rhizobia: mutualism, parasitism and foregoing symbiosis // *FEMS Microbiol. Lett.* 2004. V. 237. № 1. P. 187–193.
<https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.07.013>
33. *Provorov N.A.* Genetic individuality and inter-species altruism: Modelling of symbiogenesis using different types of symbiotic bacteria // *Biol. Communicat.* 2021. V. 66. № 1. P. 65–71.
<https://doi.org/10.21638/spbu03.2021.108>
34. *Darlington P.J.* Altruism: its characteristics and evolution // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1978. V. 75. № 2. P. 385–389.
35. *Janzen D.H.* When is it coevolution? // *Evolution.* 1980. V. 34. № 3. P. 409–416.
<https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1980.tb04849.x>
36. *Provorov N.A.* Coevolution of rhizobia with legumes: facts and hypotheses // *Symbiosis.* 1998. V. 24. № 3. P. 337–367.
37. *Kleinschmidt B., Kölsch G.* Adopting bacteria in order to adapt to water – how reed beetles colonized the wetlands (Coleoptera, Chrysomelidae, Donaciinae) // *Insects.* 2011. V. 2. № 2. P. 540–554.
<https://doi.org/10.3390/insects2040540>
38. *Проворов Н.А., Тихонович И.А., Воробьев Н.И.* Симбиогенез как модель для реконструкции ранних этапов эволюции генома // *Генетика.* 2016. Т. 52. № 2. С. 137–145.
<https://doi.org/10.7868/S0016675816020107>
39. *Oberholzer T., Wick R., Luisi P.L., Biebricher C.K.* Enzymatic RNA replication in self-reproducing vesicles: An approach to a minimal cell // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1995. V. 207. № 2. P. 250–257.
40. *Kurihara K., Okura Y., Matsuo M. et al.* A recursive vesicle-based model protocell with a primitive model cell cycle // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. № 8352.
<https://doi.org/10.1038/ncomms9352>
41. *Brueckner J., Martin W.F.* Bacterial genes outnumber archaeal genes in eukaryotic genomes // *Genome Biol. Evol.* 2020. V. 12. № 4. P. 282–292.
<https://doi.org/10.1093/gbe/evaa047>
42. *Douglas A.E.* The molecular basis of bacterial–insect symbiosis // *J. Mol. Biol.* 2014. V. 426. № 7. P. 3830–3837.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.04.005>
43. *Ku C., Nelson-Sathi S., Roettger M. et al.* Endosymbiotic gene transfer from prokaryotic pangenomes: inherited chimerism in eukaryotes // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. № 33. P. 10139–10146.
<https://doi.org/10.1073/pnas>
44. *Famintzin A.S., Baranetzky O.V.* Zur Entwicklungsgeschichte der Gonidien und Zoosporenbildung der Flechten // *Mémoires de l'Académie imp. des sciences de St.-Petersbourg, 7 série.* 1867. V. 11. № 9.
45. *Фаминцын А.С.* О роли симбиоза в эволюции организмов // *Зап. Имп. акад. наук, физ.-мат. отд. Серия 8.* 1907. Т. 20. № 3. С. 1–14.
46. *Проворов Н.А.* К.С. Мережковский и происхождение эукариотической клетки: 111 лет теории симбиогенеза // *Сельскохозяйств. биология.* 2016. Т. 51. № 5. С. 746–758.
<https://doi.org/10.15389/agrobiology.2016.5.746rus>
47. *Sagan D.* From Empedocles to Symbiogenetics: Lynn Margulis's revolutionary influence on evolutionary biology // *BioSystems.* 2021. V. 204:104386.
<https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2021.104386>
48. *Инге-Вечтомов С.Г.* Ретроспектива генетики. СПб.: Изд-во Н-Л, 2015. 336 с.
49. *Проворов Н.А.* Симбиогенез как эволюция генетических систем открытого типа // *Генетика.* 2018. Т. 54. № 8. С. 879–889.
<https://doi.org/10.1134/S0016675818080106>
50. *Пронозин А.Ю., Брагина М.К., Салина Е.А.* Пангеномы сельскохозяйственных растений // *Вавил. журн. генетики и селекции.* 2021. Т. 25. № 1. С. 57–63.
<https://doi.org/10.18699/VJ21.007>

Symbiogenetics and Symbiogenesis: Molecular and Ecological Bases of Integrative Evolution

N. A. Provorov^{a, *} and I. A. Tikhonovich^{a, b}

^a*All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, St.-Petersburg, 196608 Russia*

^b*St.-Petersburg State University, St.-Petersburg, 199034 Russia*

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

Symbiogenetics is presented as a discipline aimed to study the combined genetic systems resulted from co-evolution of unrelated organisms. Their research complements the methodology of genetic analysis with the approaches of “genetic synthesis” aimed at characterizing the molecular and ecological factors of integration of heterologous genomes. Hologenomes and symbiogenomes that arise via integrative evolution (symbiogenesis) are dissected, like prokaryotic pangenomes, into the core and accessory parts. In hologenome, the core part, which is constant in composition, is represented by the host genome (nuclear-cytoplasmic system of heredity), and the variable accessory part composed by metagenome of the microbial community which is associated with the host and performs functions useful for it. Mechanisms of symbiogenesis go beyond the factors of evolution of free-living organisms and include: (a) interspecies altruism associated with the refusal of symbionts from autonomous existence, and upon a deep reduction, from the ability to maintain the genome; (b) inheritance by host of symbionts as of “acquired” genetic determinants (pangeneses). Under the impacts of these factors, symbionts can be transformed into cellular organelles that have lost their genetic individuality and sometimes lack genomes. Symbiogenesis is presented as a multi-stage process, including the emergence of: (i) genome-containing prokaryotic cell; (ii) multi-genomic eukaryotic cell; (iii) multicellular eukaryotes as holobionts composed of host organisms and associated microbial communities. Genome-free organelles that have retained the basic reproductive and metabolic functions can be used as models for reconstructing the early stages of cell evolution, including the emergence of cellular genome.

Keywords: facultative and obligatory symbioses, symbiogenetics, symbiogenesis and organellogenesis, hologenomes and symbiogenomes, natural selection, pangeneses, biological altruism, open-type genetic systems, horizontal and endosymbiotic gene transfer, cell evolution.

СТРУКТУРА И РАЗНООБРАЗИЕ ДНК-ТРАНСПОЗОНОВ *Tc1/mariner*
В ГЕНОМЕ УШАСТОЙ МЕДУЗЫ *Aurelia aurita*© 2023 г. Ю. Н. Улупова¹, Л. В. Пузакова¹, М. В. Пузаков¹, *¹Федеральный исследовательский центр “Институт биологии южных морей
им. А. О. Ковалевского” Российской академии наук, Севастополь, 299011 Россия

*e-mail: puzakov@ngs.ru

Поступила в редакцию 30.03.2022 г.

После доработки 08.08.2022 г.

Принята к публикации 30.08.2022 г.

Мобильные генетические элементы — ДНК-транспозоны и ретротранспозоны — это последовательности ДНК, способные к перемещениям внутри генома. Предполагается, что они играют одну из ключевых ролей в адаптивных и эволюционных процессах. Одной из наиболее изученных групп ДНК-транспозонов является инфракласс *ITm* и, в частности, суперсемейство *Tc1/mariner*. В настоящей работе мы рассмотрели представленность, структуру и эволюцию ДНК-транспозонов *Tc1/mariner* ушастой медузы *Aurelia aurita*. Было установлено, что преобладающая доля элементов *Tc1/mariner* медузы представлена семейством *TLE*. Выявлено новое подсемейство элементов *TLE*, названное *Aurum*. Кроме того, в семействе *Visitor* обнаружены две группы элементов *VS-aura* и *VS-beplau*, которые, вероятно, также являются отдельными подсемействами. Анализ структуры и разнообразия элементов *Tc1/mariner* показал, что в настоящий момент транспозоны *Tc1/mariner* в геноме медузы находятся на стадии деградации и элиминации. Практически все элементы делетированы или имеют структурные изменения и соответственно не имеют потенциально функциональных копий.

Ключевые слова: *Aurelia aurita*, мобильные генетические элементы, *Tc1/mariner*, транспозаза, ДНК-транспозоны.

DOI: 10.31857/S0016675823020133, EDN: KYLGLQ

Мобильные генетические элементы (МГЭ) — это последовательности ДНК, способные к самостоятельным перемещениям внутри генома. Впервые мобильные генетические элементы были описаны в 1940-х гг. Барбарой Макклинтон [1]. В настоящее время известно, что они встречаются практически во всех организмах и суммарно составляют большой процент генома у высших эукариот [2, 3]. Известно, что последовательности МГЭ могут быть основой для возникновения новых генов или регуляторных последовательностей [4]. Кроме того, МГЭ являются высокомутабильными структурами геномов организмов, а также вносят существенный вклад в спонтанный мутагенез, формируя хромосомные перестройки (делеции, инверсии, дупликации), тем самым вызывая как вредные, так и полезные мутации для организма и популяции в целом. Предполагается, что они играют одну из ключевых ролей в адаптивных и эволюционных процессах [5].

МГЭ эукариот можно разделить на два класса — ретротранспозоны и ДНК-транспозоны [4, 6]. Ретротранспозоны — элементы I класса, кодируют обратную транскриптазу и для своего перемещения используют в качестве посредника молекулу

РНК. Такой механизм называется “копирование—вставка”. С помощью этого механизма ретротранспозонам удается быстро увеличивать число копий. ДНК-транспозоны — элементы II класса, кодируют транспозазу и перемещаются по геному без копирования путем вырезания собственной копии и ее последующей вставки в какой-либо другой участок генома. Такой механизм называется “вырезание—вставка” [4, 6].

Одной из наиболее изученных групп ДНК-транспозонов является *ITm*-элементы. На данный момент элементы *ITm* обнаружены у большинства живых организмов [7, 8]. В геномах можно обнаружить несколько сотен и даже тысяч копий этой группы [9–11]. Протяженность *ITm*-элементов составляет от 1 до 3 тыс. пар нуклеотидов. Транспозоны *ITm* имеют концевые инвертированные повторы (КИП), длина которых составляет от 20 до 1900 пн [12, 13]. У некоторых транспозонов есть и субконцевые инвертированные повторы (СИП), длиной от 175 до 1403 пн [13]. В центральной части транспозона находится, как правило, единая открытая рамка считывания (ОРС), кодирующая фермент транспозазу, длина которого варьирует от 350 до 650 а.о. Для транспозазы элементов *ITm*

свойственно наличие ДНК-связывающего домена (PAIRED) и каталитического домена (DDE/D). ДНК-связывающий домен находится в N-концевой части транспозазы и состоит из шести α -спиралей. Первые три α -спирали получили название PAI-субдомен, вторые три α -спирали – RED-субдомен. Между этими доменами находится GRPR-подобный мотив, который обеспечивает связывание PAIRED с ДНК-мишенью [14]. Каталитический домен находится на C-концевой части транспозазы. DDE/D-домен обладает эндонуклеазной и лигирующей активностью, обеспечивая вырезание и вставку МГЭ. Также транспозаза *ITm* может включать NLS-мотив (сигнал ядерной локализации). NLS-мотив предположительно обеспечивает транспорт транспозазы из цитоплазмы в ядро [15, 16].

На данный момент *ITm*-транспозоны классифицируют как инфракласс, так как эта группа включает несколько суперсемейств: *Tc1/mariner*, *pogo*, *IS630*, *Sailor*, *Gambol* [8, 17, 18]. Суперсемейство *Tc1/mariner* включает в себя несколько семейств: *Tc1*-подобные элементы (*TLE/DD34-46E*), *mariner*-подобные элементы (*MLE/DD34D*), *Visitor* (*DD41D*), *maT* (*DD37D*), *Guest* (*DD39D*), *mosquito* (*DD37E*), *L18* (*DD37E*), *L31* (*DD37E*) [11, 13, 17, 19–21].

Здесь мы рассматриваем представленность, структуру и эволюцию ДНК-транспозонов *ITm* суперсемейства *Tc1/mariner* медузы *Aurelia aurita*. Ушастая медуза *Aurelia aurita* (также называемая обыкновенной медузой или лунной медузой) является разновидностью рода *Aurelia* (тип Cnidaria, класс Scyphozoa). Вид *A. aurita* встречается в Северном, Черном, Балтийском и Каспийском морях, северо-восточной Атлантике, Гренландии, северо-востоке США и Канаде, северо-западной части Тихого океана и Южной Америке [22, 23]. Ушастые медузы являются одним из важных компонентов многих экосистем, кроме того обладают удивительной способностью выдерживать значительные колебания температур и солености воды [24]. У медузы *A. aurita*, а также у других представителей Scyphozoa структура, эволюция и представленность элементов *Tc1/mariner* практически не изучены.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поиск транспозонов

Для поиска ДНК-транспозонов суперсемейства *Tc1/mariner* был использован BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). В качестве матрицы использовались аминокислотные последовательности транспозаз *Tc1/mariner*, таких семейств как *TLE* (*Passport* (CAB51371), *Mariner-5_CGI*

(Repbase), *DrTRT* [25], *IN_Machilis_hrabei* [26], *TR-Habu* [27], *IT_Cf* [28], *MLE* (*Heteropoda venatoria* (BAP05478), *Mamestra brassicae* (AAL69970), *Adineta vaga* (AAZ67099), *Girardia tigrina* (CAA50801), *Bytmar1* (CAD45367), *Bombyx mori* (ABF51498), *Tvmar1* (AAP45328)); *Visitor* (*Crmar2.5* (AAK61417)), *maT* (*Bmmar1* (U47917)), *Guest* (*Soymar1* (AF078934)), *mosquito* (*Ae-atropalpus1* (AF377999)). Полногеномные последовательности ДНК медузы *A. aurita* (GCA_004194415) были взяты из базы данных NCBI. Для того чтобы выяснить являются ли нуклеотидные последовательности МГЭ полными, мы брали гомологичные транспозазе последовательности с наивысшей идентичностью к матрице из соответствующих скаффолдов. У каждой извлеченной последовательности был совершен поиск инвертированных повторов (КИП и СИП) с помощью BLASTn [29]. Полная последовательность каждого нового обнаруженного элемента использовалась для уточнения границ и определения количества копий, присутствующих в геноме. Копии с протяженностью от 10 до 100% от длины полноразмерного МГЭ подсчитывались как общее количество копий. Копии менее 10% от длины полноразмерного МГЭ при подсчете не учитывались. Копии, которые составляли >95% от длины полноразмерного МГЭ, имели КИП и полную транспозазу (~300 а.о.), считались полноразмерными. Потенциально функциональными копиями мы считали такие элементы, у которых были интактная транспозаза (отсутствие стоп-кодонов и сдвигов ОРС), КИП, ДНК-связывающий домен (PAIRED), GRPR-мотив и каталитический домен (DDE/D).

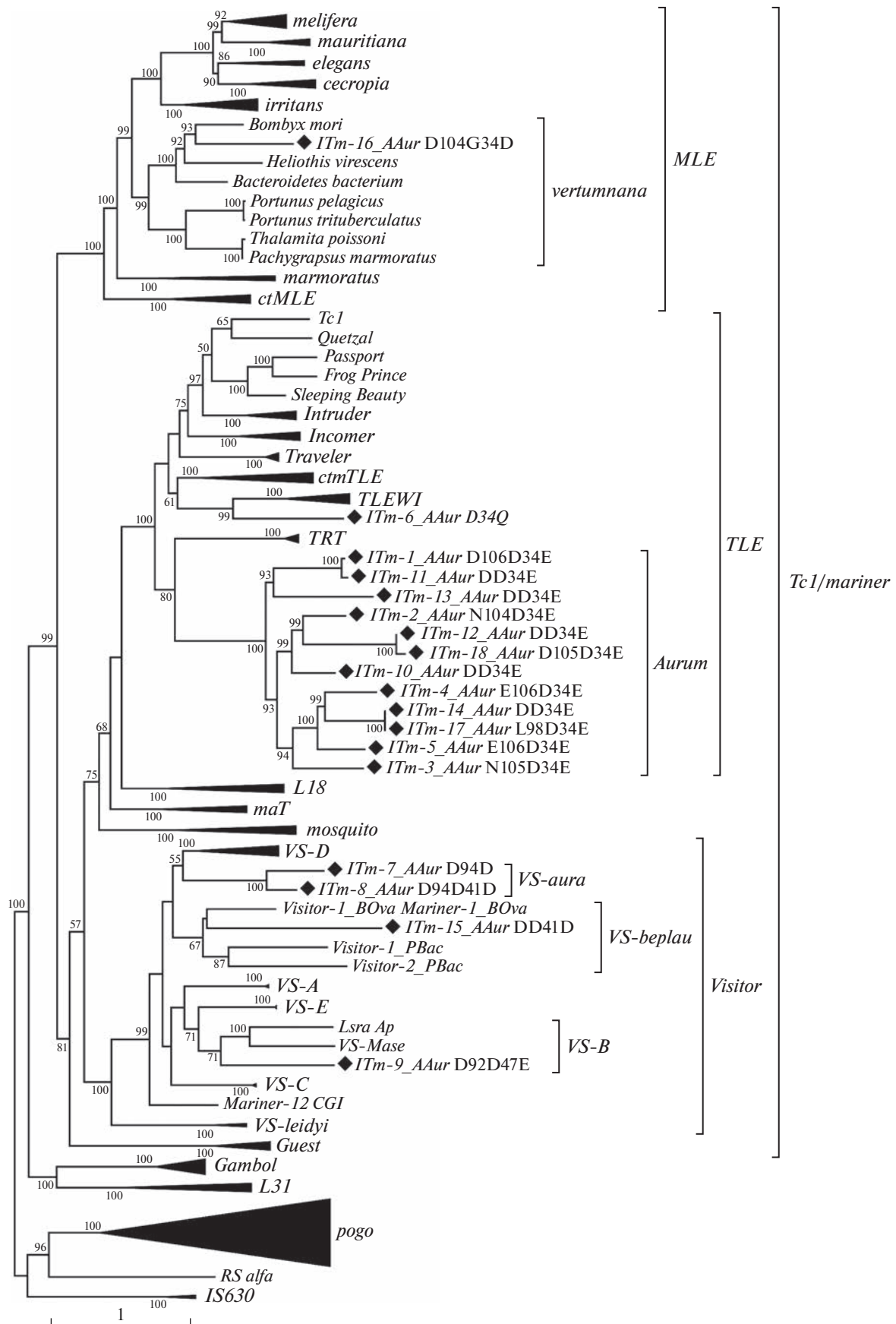
Анализ последовательностей

Границы предполагаемых ОРС определяли с помощью ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) и далее уточняли визуально. Последовательность сигнала ядерной локализации (NLS) выявляли с помощью ScanProsite [30]. ДНК-связывающий мотив PAIRED определяли, используя PSIPRED v3.3 [31]. Мотив GRPR-типа, а также DDE/D-домен идентифицировали визуально.

Филогенетический анализ

Для филогенетического анализа были взяты аминокислотные последовательности транспозаз, относящиеся к различным группам суперсемейства *ITm*-транспозонов (рис. 1). Множественное выравнивание аминокислотных последова-

Рис. 1. Эволюционные взаимоотношения *ITm*-транспозонов. Черными ромбами обозначены ДНК-транспозоны *A. aurita*. Достоверность топологии оценивалась с использованием бутстреп-теста (1000 репликаций). Значения коэффициентов поддержки бутстреп-теста менее 50% не обозначены.



тельностью было выполнено с помощью MUSCLE [32] с использованием стандартных настроек. Поиск наилучшей модели для филогенетического анализа и филогенетический анализ проводились с использованием MEGA7.0 [33] по методу максимального правдоподобия.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проанализировав геном медузы *A. aurita*, нами было обнаружено 18 МГЭ (табл. 1). Для того чтобы соотнести к каким группам суперсемейства *Tc1/mariner* они относятся, мы провели филогенетический анализ. Для филогенетического анализа были использованы все известные семейства группы *Tc1/mariner*. В качестве внешней группы были задействованы аминокислотные последовательности элементов суперсемейств *IS630* и *pogo*. В результате филогенетического анализа было установлено, что 13 элементов (*ITm-1_AAur*, *ITm-2_AAur*, *ITm-3_AAur*, *ITm-4_AAur*, *ITm-5_AAur*, *ITm-6_AAur*, *ITm-10_AAur*, *ITm-11_AAur*, *ITm-12_AAur*, *ITm-13_AAur*, *ITm-14_AAur*, *ITm-17_AAur*, *ITm-18_AAur*) входят в семейство *TLE*, четыре элемента (*ITm-7_AAur*, *ITm-8_AAur*, *ITm-9_AAur*, *ITm-15_AAur*) относятся к семейству *Visitor* и еще один элемент (*ITm-16_AAur*) принадлежит к семейству *MLE*. МГЭ, относящиеся к семействам *maT*, *mosquito*, *Guest*, *L18*, обнаружить не удалось (рис. 1). Отсутствие у ушастой медузы элементов *L18* также было показано ранее [34].

Visitor/DD41D

На данный момент элементы *Visitor/DD41D* классифицируют как отдельное семейство [11, 13]. Это семейство было разделено на шесть подсемейств (*VS-A*, *VS-B*, *VS-C*, *VS-D*, *VS-E*, *Leidy*) [35]. В настоящем исследовании в геноме медузы мы обнаружили 4 МГЭ, относящихся к группе *Visitor* (табл. 1). Элементы *ITm-15_AAur*, *Visitor-1_PBac*, *Visitor-2_PBac*, *Visitor-1_BOva* сформировали группу с достаточно высоким значением бутстрепа (67%), названную нами *VS-beplau*. Элементы *ITm-7_AAur*, *ITm-8_AAur* сформировали группу (бутстреп 100%), которую мы назвали *VS-aura*. Можно предположить, что элементы *ITm-7_AAur*, *ITm-8_AAur* являются частью группы *VS-D* с низким значением бутстрепа (55%). Элемент *ITm-9_AAur* вошел в группу *VS-B* (рис. 1).

Для МГЭ семейства *Visitor* общая длина транспозонов составляет примерно 1300–4400 пн. Длина КИП варьирует от 15 до 1900 пн [11, 13, 36]. У *ITm-8_AAur* КИП обнаружить не удалось, следовательно элемент не способен к перемещению, однако ОРС транспозазы *ITm-8_AAur* не имеет повреждений. Это может свидетельствовать о том, что транспозаза сохраняет свою ферментативную активность. У элемента *ITm-15_AAur* общий раз-

мер транспозона был типичен для этого семейства (1847 пн), а также были обнаружены КИП типичного размера (87 пн). Однако транспозаза элемента оказалась делетированной (107 а.о.). Элементы *ITm-7_AAur*, *ITm-9_AAur* представляют собой укороченные последовательности транспозазы без КИП (табл. 1).

У элементов *ITm-7_AAur*, *ITm-8_AAur* общее число копий составило от 23 до 29. Элемент *ITm-9_AAur* присутствует в виде единственной копии. *ITm-15_AAur* был представлен 129 копиями. При этом у четырех обнаруженных МГЭ полноразмерных копий не выявлено (табл. 1).

Как известно, потенциальную активность *mariner*-подобных транспозаз можно оценить по наличию ДНК-связывающего домена PAIRED, GRPR-мотива в головной части белка и каталитического домена (DDE/D) в хвостовой части. Также у некоторых *mariner*-подобных транспозаз определяется NLS – последовательность сигнала ядерной локализации.

Анализ транспозаз обнаруженных нами элементов показал, что PAI-субдомен присутствует только в транспозазах элементов *ITm-7_AAur* и *ITm-8_AAur* – у транспозазы элемента *ITm-7_AAur* в наличии только одна альфа-спираль, а у транспозазы элемента *ITm-8_AAur* две спирали вместо трех. Вторые три альфа-спирали RED-субдомена обнаружались у транспозазы элемента *ITm-8_AAur*, но третья альфа-спираль очень укорочена, что скорее всего свидетельствует о ее нефункциональности.

GRPR-мотив найден в транспозазах элементов *ITm-7_AAur* и *ITm-8_AAur*. Он расположен типично, в головной части белка, между PAI и RED субдоменами. NLS у элементов данного семейства не найден.

Каталитическому домену для сохранения своей ферментативной активности необходимо наличие всех трех маркерных аминокислотных остатков (двух аспаргатов (D) и третьего глутамата (E) или аспартата – DDE/D-домен), поэтому данная область обладает наибольшей консервативностью по сравнению с другими частями транспозазы [37] (рис. 1). В большинстве случаев для семейства *Visitor* характерен каталитический домен DD40–41D [38]. *ITm-8_AAur* имеет классический домен, свойственный транспозонам этой группы. У *ITm-15_AAur* сохранилась только вторая часть каталитической триады D41D. У двух других элементов – *ITm-7_AAur* и *ITm-9_AAur* в домене имелись видимые отличия, а именно у элемента *ITm-7_AAur* третий D (аспартат) в каталитической триаде отсутствовал, а у элемента *ITm-9_AAur* он был заменен на E (глутамат), также количество аминокислотных остатков между аспаргатом и глутаматом составило 47 вместо типичных 40–41 (рис. 2). Данные изменения в консервативном домене вероят-

Таблица 1. ДНК-транспозоны суперсемейства *Tc1/mariner* в геноме медузы *A. aurita*

Элемент	Семейство/ подсемейство	Длина, пн	КИП, пн	СИП, пн	ТП, а.о.	Общее число копий	Число ПР	Число ПФ	Каталитический домен*
<i>ITm-1_AAur</i>	<i>TLE/Aurum</i>	4322	90/90	—	359	9	1	1	D106D34E, DNDPSQ
<i>ITm-2_AAur</i>	<i>TLE/Aurum</i>	2152	26/26	—	358	31	5	2	N104D34E, DGDPSQ
<i>ITm-3_AAur</i>	<i>TLE/Aurum</i>	4614	229/230	—	370	415	1	0	N105D34E, DGDPSQ
<i>ITm-4_AAur</i>	<i>TLE/Aurum</i>	963	—	—	320	8	0	0	E106D34E, DGDPSQ
<i>ITm-5_AAur</i>	<i>TLE/Aurum</i>	960	—	—	319	9	0	0	E106D34E, DGDPSQ
<i>ITm-6_AAur</i>	<i>TLE</i>	267	—	—	89	1	0	0	?D34Q, DNNPKH
<i>ITm-7_AAur</i>	<i>Visitor/VS-aura</i>	813	—	—	270	23	0	0	D94D?, DGGAH
<i>ITm-8_AAur</i>	<i>Visitor/VS-aura</i>	1044	—	—	347	29	0	0	D94D41D, DGAPAH
<i>ITm-9_AAur</i>	<i>Visitor/VS-B</i>	699	—	—	232	1	0	0	D92D47E, DGAPPH
<i>ITm-10_AAur</i>	<i>TLE/Aurum</i>	381	—	—	127	6	0	0	D92D47E, DGDPSQ
<i>ITm-11_AAur</i>	<i>TLE/Aurum</i>	249	—	—	89	5	0	0	?D34E, DNDPSQ
<i>ITm-12_AAur</i>	<i>TLE/Aurum</i>	249	—	—	84	8	0	0	?D34E, DGDPSQ
<i>ITm-13_AAur</i>	<i>TLE/Aurum</i>	348	—	—	116	5	0	0	?D34E, DKDPSQ
<i>ITm-14_AAur</i>	<i>TLE/Aurum</i>	321	—	—	106	6	0	0	?D34E, DGCPRQ
<i>ITm-15_AAur</i>	<i>Visitor/VS-beplau</i>	1847	87/87	—	107	129	0	0	?D41D, DDAPVH
<i>ITm-16_AAur</i>	<i>MLE/vertumnana</i>	1325	50/52	—	347	49	22	0	D104G34D, GHASAH
<i>ITm-17_AAur</i>	<i>TLE/Aurum</i>	3770	34/35	40/41	303	28	3	0	L98D34E, DGCPRQ
<i>ITm-18_AAur</i>	<i>TLE/Aurum</i>	732	—	—	244	5	0	0	D105D34E, DGDPSQ

Примечание. пн — пары нуклеотидов, а.о. — аминокислотные основания, КИП — концевые инвертированные повторы, СИП — субконцевые инвертированные повторы, ТП — транспозаза, ПР — полноразмерные копии, ПФ — потенциально-функциональные копии, * — указан паттерн DDE/D-домена, включающий маркерные аминокислотные основания и протяженность между ними в а.о., а также консервативную область из шести а.о. в районе второго маркерного аминокислотного основания, “?” — неидентифицированный элемент каталитического домена.

<i>Itm-1_Aaur</i>	--MVFHKKIDSKRAYINYLRSVASMSYRKIACICGISPSSVLRICREGKVKPK-----QTRS GRPV AMNDRKRDRFLRFRSMREDN--PNLTVMETIAKEGDI
<i>Itm-2_Aaur</i>	--MARPTISAEATRAYIKYKNSNVGKLVKETTYSRQIYKIWKESLGGKREKDL-----KSVG GRSS KLSDVRDKRILRLVTTLRGQE--PNWTIKEMMARADV
<i>Itm-3_Aaur</i>	--MVFKGKYDSKVRENILKLKKEGKWTVKEICQICSVSRRTTVKRVCSKANKVFNNTSAIGKVFVAPKK GRPR MLDERDERKILRQIEAFRRGDNTGRFSLNQVRKAAGL
<i>Itm-4_Aaur</i>	-----MKKPIDDIIDKR----- RNNKGRPPKLTARDKRN ILRQVEILRRDY--GYFTTKRLKVFAGV
<i>Itm-5_Aaur</i>	-----MGIGAVKYDGR-----HKNT GRRK KLTERDERNIFRKLHLRGSN--GTFSSKEIQKSAGL
<i>Itm-6_Aaur</i>	-----MYWPDVPAPAKSSIRKLYQKFEHGTCLDRN-----KGN GRSR TARIPENVERVREFLTEDGVT-----SSRR
<i>Itm-8_Aaur</i>	MSLVENAYQVRRSWEDHWPPIGAPSPARTIRNNYAKYREHGTSLNMN-----RERS GRPR TARSDONVERVRSRLQRNGDV-----SARR
<i>Itm-9_Aaur</i>	-----
<i>Itm-10_Aaur</i>	-----
<i>Itm-11_Aaur</i>	-----
<i>Itm-12_Aaur</i>	-----
<i>Itm-13_Aaur</i>	-----
<i>Itm-14_Aaur</i>	-----
<i>Itm-15_Aaur</i>	-----
<i>Itm-16_Aaur</i>	-----MELQTHWRAMIFYD*KSGLNQOQS-----HDLRQAVFGT*APSQSTVYDRFPEF*RGH--GSLEDDPRSGGCAT
<i>Itm-17_Aaur</i>	-----K GRPS KLAKDKRRILRSVPHLRDSD--GSFTSPRIAEVACV
<i>Itm-18_Aaur</i>	-----KLDNKTANRKRNF-----
<i>Itm-1_Aaur</i>	SD--VSYRTLVRTL--NAGYRSLR PRRK GILSAKDKKKRVRYARNALK-K-----LEKS-----FWVDVLMYLDGVSFVHKTNPYKDALTPNGRVWRKISEG
<i>Itm-2_Aaur</i>	KN--VSRRTFSRFL--SKEGYNYLQARKKGLLSERDKKTRVKFAKKMLR-E-----HHFG-----VWINEIAFYLDGAGFVYKRNPLDQSLAPRGRVWRT--EG
<i>Itm-3_Aaur</i>	GT--VPLYTIR*VL-LRHGFAYRQARKKGLLTAKDLKKRYNFAMKMR-D-----YSGD-----VWKNEISFYLDGKSFVHKMNPSTCTSPRARVWRKRGEG
<i>Itm-4_Aaur</i>	SPE-ISDET VRVL--RDAGFKYTHFRKK GILSRNDLQTRFEAKTVRR-R-----LARA-----VWTEGIAFYLDGVGFTHKYNPHDQALAPRTMAWRPADG
<i>Itm-5_Aaur</i>	SEKDISNRTVRRCL--NARGYQFLQCRTKGLLTADLKKRKLKFAKTCK-L-----LSDK-----FWREGVSFYLDGTGFAHKVNPSPYARTQRTRAW KRGE G
<i>Itm-6_Aaur</i>	-----
<i>Itm-7_Aaur</i>	NGLGLSQSSYVRIT--KEIGFHPYVLARKQKLENGDQAKRLEFCN*ILETVARESEMINNF-----ITSDEPNFSLNS-----EINTKNGVFIYARRDIG
<i>Itm-8_Aaur</i>	NGMH ISRSSFSRIVQKDLRFHPYVLIERQELLPNDPAKRLEFCN*INQSNDEAFITNL-----VTSDEAFISLNS-----EVNKNWVVKYARYNG
<i>Itm-9_Aaur</i>	-----NRLHFARLVQRQLRNGTLDLQEV-----MWSDEATFDLNG-----GVNTWNTRSYAEKNG
<i>Itm-10_Aaur</i>	-----
<i>Itm-11_Aaur</i>	-----
<i>Itm-12_Aaur</i>	-----
<i>Itm-13_Aaur</i>	-----
<i>Itm-14_Aaur</i>	-----
<i>Itm-15_Aaur</i>	-----
<i>Itm-17_Aaur</i>	AITDVQVAHVHVVDEDA*VTVLQIAEEVGISSGNVSKILHNSLGIRNVSAWVPHMLTGEKRRACADAI PWKKNLTEEDLMQFGR*SVVMKHGFTVLILNKAADVSTDA
<i>Itm-18_Aaur</i>	ENK--VSNRT IRVL--RSDGYSYLSRKK GLMTQKDLKKRMKFCRTVRKLK-----LGQD-----FWNYHISFYLDGKGFEFKTNPLDQAKAPRARE WRKSE G
<i>Itm-18_Aaur</i>	-----WKFNSDSKSFHKHKNQTRVQFAKMLAN-----YDSS-----LCTEKIAFYLDGSNN-----EDLETSGRPF-----
<i>Itm-1_Aaur</i>	LT--YTTKSGSKDLPGRRLHLVLGVTHGLGVTVTEYT--KMNG--AYFARFIQTMTERALGDIADVQDKN--NFIFVMDNDPSONSKVAKKALED-----I
<i>Itm-2_Aaur</i>	LLRGCTAKEQACGTGGKHVKMVAISHGKGVVCAQRYE--KMNG--TFARFLIENFDKMV--EAAGKS--SRMWIODGDPSONSKLAKEAMKQ-----V
<i>Itm-3_Aaur</i>	MEKSCTRFSGSKGAGGRKVNFLVCI SHGHGVCVSRQYE--KMDG--VYFTSYVKDESPRLF--RDVGKKA--EKLWIODGDPSONCKSARIAWES-----L
<i>Itm-4_Aaur</i>	LSFQQTSGSGHEGSGCKTAHFVAIAKYKGVILAEQYEGQLNG--QKFAEFVREQFPTLF--ERSSNPK--GKLFLODGDPSONSKKAREAMYQ-----V
<i>Itm-5_Aaur</i>	LTIHCTAGKKE TGGGRVAKFMVAIAFGKGVKICQYEGNING--ELFAEFVQEQEPPMF--ENSSNPK--GKLFLODGDPSONSKVYQGAMDS-----V
<i>Itm-6_Aaur</i>	-----LLCWGAISNCGASSLC--LFQGRMDA--PFYQDILGDVLYPIYI--DE*FAED--PHRFMODNNPKHARTASTKEYFND-----N
<i>Itm-7_Aaur</i>	HPEHHYVEFKQ--GPGQVMVWGLTKNGNIFCPHFVQGTLDTAEYLRIYRVHVQREF--REQGIVKE--RILWQODGGSASHTSNRSIHYLQGHFPGKII SR-----R
<i>Itm-8_Aaur</i>	HPDDHYIGRRQ--GAGQVMVWGLTGNGDILGPHFAENNLNTRAILRIYRVVQREF--ANKGIDRN--TVWQODGAPAHTSNRSIHYLQGHFPGKIVSK-----R
<i>Itm-9_Aaur</i>	PLEFIRERCQNK---AKLHCWAALRNGEK--FGIFFFDQNTA--QYTTILSRLLPMIRARGIDAARN---VVFOQDCAPPHVAUTVYRLDRKFRVSKRPNAAQNA
<i>Itm-10_Aaur</i>	-----LNG--GNFAQFVLDKFDIIF--DSAQKN--SRMWIODGDPSONSKLAKEAMIA-----V
<i>Itm-11_Aaur</i>	-----EYIT--QKNG--YFARFIQTMTERAFGDIADVQDKN--NFIFVMDNDPSONSKIAKKALED-----I
<i>Itm-12_Aaur</i>	-----KMDG--NYFASFIRENFDITF--LASGKS--TNTWLODGDPSONSAIARVEMDK-----M
<i>Itm-13_Aaur</i>	-----GVILIEPYK--KMDA--KHFSKFVKDKLNACF--ARAGPRVEGKQIFVMDKDPSONSKSGLEAIISS-----V
<i>Itm-14_Aaur</i>	-----FLODCCPRONCKKAMDAYS-----I
<i>Itm-15_Aaur</i>	-----EKFSIWVGLSGHGLVFGTFVFDGNGINLNYLHTIEFLFPRLADQFNYQAH*MFQQLWMDODAPVHRLIAIWNRLAELFGNHVVAL-----I
<i>Itm-16_Aaur</i>	SWKEAPQKFHSHSTVAKQMAIVFVSRAHGLATIPLVQRTVTA--AWYKDCPCVLATVAERRPRTRRRGLLHGHASAHMSATTQEFLLQA-----E
<i>Itm-17_Aaur</i>	LKLGCTAGKKE --GAVNSNFMIGISYNRGVVLCQYFGPING--DVMEIISHSAPFRAF--EQSIDPK--GKRFLODCCPRONCKKAMDAYS-----V
<i>Itm-18_Aaur</i>	--TIRLHN*G*QKWPGGNV*ITAIISYGVGVVAHVPEY--KMDG--DYFASFCIENFDITF--LASGKS--TNTWLODGDPSONSAIARAEMDK-----M
<i>Itm-1_Aaur</i>	GAELQAIPPRSPDLNPIENV--FHNVRILRQQAEEERIERENFASFKNRVLGLVANSNIGIINRTI--ETMRDLKLIASGGCRKY*--
<i>Itm-2_Aaur</i>	NSQLPIPPRSPDVNPIENF--FGIVKQALHRDALERQPNVETINQFESRIKRTMNEVPATIDKII--ESMNRKMKIITEFKGERTKY*--
<i>Itm-3_Aaur</i>	GVKLLQIPQSPDVNPIENV--VHFVAKALEKDTMEQAITHETSKQFVSVRVIRILLAIIPVSIIDKTI--ESVEKRINLIANKGRKLY*--
<i>Itm-4_Aaur</i>	GAKKFSIPRSPDLNPIENV--FHNKSKMRDDAFNKRITNETYSQFCARVKDTLLNYPTEIIDRTI--MSMDKRIDLVKAKGQIRY*--
<i>Itm-5_Aaur</i>	GCKLFKIPRSPDLNPIENV--FHLARKQLNKDAIAKDIEHETKFSRRVKSLLNPFSSVVVIDRTI--GSMGKRICEVIMKMGQRTKY*--
<i>Itm-6_Aaur</i>	NIFWWKTPEPSPVSTVION
<i>Itm-7_Aaur</i>	GDIPW--PPRSPDLAVCAFF--CGVI*--
<i>Itm-8_Aaur</i>	GDFLW--PPRSPDLAILDFFVWGHKLKHQIWKAA--QRNQPRNIDELKRAIRRECEAI PRDMVNVAF--HAMIDRCRCINSNGNCFDNE*--
<i>Itm-9_Aaur</i>	NAIAW--PPRSPDLTFLDFFLWGYLKSQVFDPLPR--TLQELSLRITTEFDLIPQEMIERATNGGLRDLKMAVARGHFEY*--
<i>Itm-10_Aaur</i>	HAELLQIPRSPDLNPIENV--FHLVKTQLNSQAIKENIVTESIDKFETRIKRTFLKTLVSHINNTI--ESMGNRMKKIIAEK-----
<i>Itm-11_Aaur</i>	GAELQAIPPRSPDLNPIENV--FHNVRILRQQAEEERIERENFASFKNRVLGLVANSNIGIINRTI--ETMRDLKLIASGGCRKY*--
<i>Itm-12_Aaur</i>	GAELFPPIPPRSPDLNPIENV--FHLVRRKLTQDAIQ-----
<i>Itm-13_Aaur</i>	EAEFHRIPTRSPDLNPIENV--FHLVKKAVDDDESMLNITNENIKQLFSILEPRPLS-----
<i>Itm-14_Aaur</i>	GATVFRIPSRSPDLNPIENV--FNCITRELKKQALEKNIRKETFEQFSRRVKKTVVEYPATKIDKII--ETMDKRIGVMVMKARGMRIKY*--
<i>Itm-15_Aaur</i>	HDIKW--PPRSDLLNPDFFF--FVFPVTSKLRGVRFDTPLDAIEAFLEHFEGRQIEWPSVQKWF-----*CMQKCIDNAGE*-----
<i>Itm-16_Aaur</i>	RVQQLQIPQSPDLNPIENV--FVFPVTSKLRGVRFDTPLDAIEAFLEHFEGRQIEWPSVQKWF-----*CMQKCIDNAGE*-----
<i>Itm-17_Aaur</i>	GATVFRIPSRSPDLNPIENV--FNCITRELKKQALEKNIRKETFEQFSRRVKKTVVEYPATKIDKII--ETMDKRIGVMVMKARGMRIKY*--
<i>Itm-18_Aaur</i>	GAELFPPIPPRSPDLNPIENV--FHLVRRKLTQDAIQDITETKHNFSQ*IQTMHEIPLEHVNKTI--CSLPKRMTEIICKGERLKY--

Рис. 2. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей транспозаз *A. aurita*. Серым выделены шесть α -спиралей, формирующих PAIRED-домен; жирным курсивом обозначен гипотетический сигнал ядерной локализации (NLS); выделен жирным и подчеркиванием GRPR-подобный мотив; черным показаны маркерные локусы каталитического домена.

но могут негативно повлиять на ферментативные свойства транспозазы.

Обобщая результаты анализа доменной структуры элементов *Visitor* ушастой медузы, мы пред-

полагаем, что семейство *Visitor* представлено в геноме только нефункциональными копиями, поскольку каждый элемент имеет какое-либо видимое повреждение.

MLE/DD34D

MLE является хорошо изученным семейством группы *Tc1/mariner* [17]. Это семейство считается одной из основных групп ДНК-транспозонов и широко представлено во всех организмах. Транспозоны *MLE* особенно часто встречаются у высших животных, где они способны к горизонтальному переносу между видами [39]. Протяженность транспозонов *MLE* составляет около 1300 пн. Размеры КИП варьируют от 20 до 40 пн и транспозаза состоит из 340 а.о. [40]. В результате филогенетического анализа было установлено, что один из обнаруженных нами элементов (*ITm-16_AAur*) относится к этому семейству (рис. 1). Общая длина транспозона и самой транспозазы, а также КИП была типична для семейства *MLE*. ОПС элемента *ITm-16_AAur* содержит множество стоп-кодонов.

Семейство *MLE* имеет характерный каталитический домен DD34D [40]. У *ITm-16_AAur* каталитический домен претерпел изменения: в каталитической триаде второй D (аспартат) был заменен на (G) глицин (рис. 2).

ДНК-связывающий мотив у транспозазы элемента *ITm-16_AAur* также оказался неполноценен: из трех альфа-спиралей в PAI-субдоме присутствуют только две. GRPR-мотив и NLS не обнаружены.

В результате анализа, проведенного с помощью программы BLASTn, было обнаружено 49 копий элемента *ITm-16_AAur*. При этом количество полноразмерных копий составило 22 (табл. 1). Однако анализ доменной структуры транспозазы показал, что все обнаруженные элементы в настоящее время являются нефункциональными.

TLE/DD34–38E

Семейство *TLE* – также одно из самых распространенных семейств группы *Tc1/mariner*. Первый представитель семейства *TLE*, транспозон *Tc1*, имеющий активную транспозазу, был обнаружен в геноме нематоды *Caenorhabditis elegans* [41, 42]. Транспозоны этой группы также широко распространены в геномах позвоночных, включая телеостных рыб [43]. Семейство *TLE* включает элементы протяженностью 1200–2000 пн [25–28, 35, 43, 44]. Для транспозонов *TLE* характерен домен DD34E [45]. Тем не менее за последние годы были обнаружены элементы *TLE* с нехарактерным доменом для этого семейства. Таким образом это семейство разделилось на несколько подсемейств: *TRT/DD37E* [25], *Incomer/DD36E* [26], *Intruder/DD38E* [28], *TLEWI/DD36E* [44], *Traveler/DD35E* [27] и *ctmTLE/DD34E* [35].

В геноме *A. aurita* мы обнаружили 13 элементов, относящихся к группе *TLE* (табл. 1). В результате филогенетического анализа 12 элементов сформировали отдельную группу *Aurum* с вы-

соким значением бутстрепа (100%) (рис. 1). На филогенетическом дереве видно, что элементы группы *Aurum* близко расположены к подсемейству *TRT*. Таким образом можно предположить, что отделившаяся группа *Aurum* представляет новое подсемейство *TLE*. Здесь же следует отметить, что элемент *ITm-6_AAur* не вошел в эту группу, а также ни в одно известное подсемейство *TLE*. Однако на основании проведенного филогенетического анализа можно сказать, что он также относится к семейству *TLE* (рис. 1).

Анализ числа копий транспозонов, относящихся к семейству *TLE*, показал, что у десяти элементов (*ITm-1_AAur*, *ITm-4_AAur*, *ITm-5_AAur*, *ITm-6_AAur*, *ITm-10_AAur*, *ITm-11_AAur*, *ITm-12_AAur*, *ITm-13_AAur*, *ITm-14_AAur*, *ITm-18_AAur*) низкое количество копий – от 1 до 9. Два элемента (*ITm-17_AAur*, *ITm-2_AAur*) имеют от 28 до 31 копии. И только один элемент (*ITm-3_AAur*) имеет очень высокое (415) число копий (табл. 1). Из 13 МГЭ этой группы полноразмерные копии обнаружены только у четырех элементов (*ITm-1_AAur*, *ITm-2_AAur*, *ITm-3_AAur*, *ITm-17_AAur*). У транспозонов *ITm-1_AAur*, *ITm-3_AAur* полноразмерные копии присутствовали в единственном числе. У *ITm-2_AAur* и *ITm-17_AAur* обнаружено пять и три полноразмерных копий соответственно.

Длина полноразмерных транспозонов группы *Aurum* варьировала от 2152 до 4614 пн, тогда как характерная длина транспозонов для семейства *TLE* составляет 1200–2000 пн. Увеличение длины могло произойти из-за вставок в некодирующую последовательность. Длина полноразмерных транспозаз варьировала от 303–370 а.о., что является типичным для транспозаз этого семейства. Также у найденных нами полноразмерных МГЭ были обнаружены КИП, длина которых колебалась от 26 до 230 пн, что также характерно для семейства *TLE*. У *ITm-17_AAur* были обнаружены СИП, длина которых составила 40/41 пн. Однако у остальных полноразмерных транспозонов СИП обнаружены не были. У других элементов (*ITm-4_AAur*, *ITm-5_AAur*, *ITm-6_AAur*, *ITm-10_AAur*, *ITm-11_AAur*, *ITm-12_AAur*, *ITm-13_AAur*, *ITm-14_AAur*, *ITm-18_AAur*) длина транспозона оказалась значительно ниже, чем у *TLE*, и составила от 249 до 963 пн. Длина транспозазы варьировала от 84 до 320 а.о. КИП обнаружены не были (табл. 1).

Необходимо добавить, что при сравнении обнаруженных консервативных доменов с характерным паттерном для семейства *TLE* (*DD34E*) нами были выявлены некоторые различия. Два элемента (*ITm-1_AAur*, *ITm-18_AAur*) имели классический домен DD34E. У других десяти элементов были отличия в каталитической триаде, а именно у элементов *ITm-2_AAur*, *ITm-3_AAur* первый аспартат (D) заменился на аспарагин (N), у

ITm-4_AAur, *ITm-5_AAur* первый аспаргат (D) — на глутамат (E), а у *ITm-17_AAur* первый аспаргат (D) — на лейцин (L). У элементов *ITm-11_AAur*, *ITm-12_AAur*, *ITm-13_AAur*, *ITm-14_AAur* первый аспаргат (D) отсутствовал, зато вторая часть каталитической триады была сохранена D34E. Также следует отметить, что у элемента *ITm-10_AAur* в каталитическом домене DD47E наблюдались различия в протяженности между вторым аспаргатом (D) и третьим глутаматом (E) (рис. 2). Однако на филогенетическом дереве видно, что этот транспозон все же относится к семейству *TLE* (рис. 1). При сравнении каталитического домена у транспозона *ITm-6_AAur* с классическим доменом семейства *TLE* (DD34E) были выявлены отличия, а именно в каталитической триаде первый аспаргат (D) отсутствовал, а глутамат (E) был замещен на глутамин (Q) (рис. 2). В результате филогенетического анализа выявлено, что транспозон *ITm-6_AAur* относится к семейству *TLE*.

Анализ транспозаз обнаруженных нами элементов показал, что первые три альфа-спирали PAI-субдомена присутствуют только в транспозазах элементов *ITm-1_AAur*, *ITm-2_AAur* и *ITm-3_AAur*, у транспозаз остальных элементов они укорочены или отсутствуют. Вторые три альфа-спирали RED-субдомена обнаружились у транспозаз элементов *ITm-1_AAur*, *ITm-2_AAur*, *ITm-4_AAur*, *ITm-5_AAur* и *ITm-17_AAur* (рис. 2). Однако у элементов *ITm-1_AAur* и *ITm-5_AAur* альфа-спирали фрагментированы, что может свидетельствовать о их нефункциональности.

GRPR-мотив присутствует в транспозазах элементов *ITm-1_AAur*, *ITm-2_AAur*, *ITm-3_AAur*, *ITm-4_AAur*, *ITm-5_AAur* и *ITm-17_AAur*.

NLS у элементов *ITm-4_AAur* и *ITm-17_AAur* локализован в двух различных районах транспозазы. В транспозазах элементов *ITm-1_AAur* и *ITm-5_AAur* найдено по одной последовательности NLS, однако только у элемента *ITm-1_AAur* NLS расположен типично, между ДНК-связывающим и каталитическим доменами. Таким образом, потенциально функциональным условно можно считать только элемент *ITm-1_AAur*, поскольку он имеет черты функционального элемента (неповрежденную ОРС, КИП, GRPR-мотив, классический каталитический домен DD34E и NLS), однако из-за фрагментации одной альфа-спирали в ДНК-связывающем мотиве он может быть нефункционален, хотя насколько это сказывается на его активности не известно. Элемент *ITm-2_AAur*, вероятнее всего, также нефункционален, так как наличие мутации первого аминокислотного остатка в каталитическом домене, который является наиболее консервативной областью, может нарушать работу транспозазы.

Преобладающая доля элементов *Tc1/mariner* медузы представлена элементами семейства *TLE*.

В этой группе обнаружено новое подсемейство, названное *Aurum*. В семействе *Visitor* обнаружены две группы элементов *VS-aura* и *VS-beplau*, которые, возможно, являются новыми подсемействами. Анализ элементов *Tc1/mariner* в геноме медузы показал, что в настоящий момент изучаемые транспозоны находятся на стадии деградации и элиминации. Практически все элементы делетированы или имеют структурные изменения и соответственно не имеют потенциально функциональных копий. Элемент *ITm-3_AAur* был, по всей видимости, очень активен в прошлом (415 копий), возможно из-за особенностей его структуры или по другим причинам, однако на момент исследования этот элемент так же, как и другие, находится на завершающей стадии жизненного цикла.

Работа проведена в рамках Государственного задания ФГБУН ИМБИ “Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом”, номер гос. регистрации 121041400077-1.

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. McClintock B. Chromosome organization and genetic expression // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1951. V. 16. P. 13–47.
<https://doi.org/10.1101/sqb.1951.016.01.004>
2. Guo B., Zou M., Gan X., He S. Genome size evolution in pufferfish: an insight from BAC clone-based *Diodon holocanthus* genome sequencing // BMC Genomics. 2010. V. 11. P. 396.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-396>
3. Feschotte C., Pritham E.J. DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes // Annu. Rev. Genet. 2007. V. 41. P. 331–368.
<https://doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090448>
4. Bourque G., Burns K.H., Gehring M. et al. Ten things you should know about transposable elements // Genome Biology. 2018. V. 19. № 1. P. 199.
<https://doi.org/10.1186/s13059-018-1577-z>
5. Piacentini L., Fanti L., Specchia V. et al. Transposons, environmental changes, and heritable induced phenotypic variability // Chromosoma. 2014. V. 123. № 4. P. 345–354.
<https://doi.org/10.1007/s00412-014-0464-y>
6. Kojima K.K. Structural and sequence diversity of eukaryotic transposable elements // Genes Genet. Syst. 2020. V. 94. P. 233–252. Epub. 2018. Nov. 9.
<https://doi.org/10.1266/ggs.18-00024>
7. Dupeyron M., Baril T., Bass C., Hayward A. Phylogenetic analysis of the *Tc1/mariner* superfamily reveals the unexplored diversity of *pogo*-like elements // Mobile

- DNA. 2020. V. 11. P. 21.
<https://doi.org/10.1186/s13100-020-00212-0>
8. Gao B., Wang Y., Diaby M. et al. Evolution of *pogo*, a separate superfamily of *IS630-Tc1-mariner* transposons, revealing recurrent domestication events in vertebrates // Mobile DNA. 2020. V. 11. P. 25.
<https://doi.org/10.1186/s13100-020-00220-0>
 9. Lee C.C., Wang J. Rapid expansion of a highly germ-line-expressed *Mariner* element acquired by horizontal transfer in the fire ant genome // Genome Biol. Evol. 2018. V. 10. № 12. P. 3262–3278.
<https://doi.org/10.1093/gbe/evy220>
 10. Xie L.Q., Wang P.L., Jiang S.H. et al. Genome-wide identification and evolution of *TC1/Mariner* in the silkworm (*Bombyx mori*) genome // Genes Genomics. 2018. V. 40. № 5. P. 485–495.
<https://doi.org/10.1007/s13258-018-0648-6>
 11. Shen D., Gao B., Miskey C. et al. Multiple invasions of *visitor*, a DD41D family of *Tc1/mariner* transposons, throughout the evolution of vertebrates // Genome Biol. Evol. 2020. V. 12. № 7. P. 1060–1073.
<https://doi.org/10.1093/gbe/evaa135>
 12. Claudianos C., Brownlie J., Russell R. et al. *maT* – a clade of transposons intermediate between *mariner* and *Tc1* // Mol. Biol. Evol. 2002. V. 19. № 12. P. 2101–2109.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a004035>
 13. Zhang H.H., Shen Y.H., Xiong X.M. et al. Identification and evolutionary history of the DD41D transposons in insects // Genes Genomics. 2016. V. 38. P. 109–117.
<https://doi.org/10.1007/s13258-015-0356-4>
 14. Ivics Z., Izsvák Z. *Sleeping Beauty* transposition // Microbiol. Spectrum. 2015. V. 3. № 2. MDNA3-0042-2-14.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0042-2014>
 15. Ivics Z., Hackett P.B., Plasterk R.H., Izsvák Z. Molecular reconstruction of *Sleeping Beauty*, a *Tc1*-like transposon from fish, and its transposition in human cells // Cell. 1997. V. 91. № 4. P. 501–510.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80436-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80436-5)
 16. Plasterk R.H., Izsvák Z., Ivics Z. Resident aliens: the *Tc1/mariner* superfamily of transposable elements // Trends in Genet. 1999. V. 15. № 8. P. 326–332.
[https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(99\)01777-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(99)01777-1)
 17. Tellier M., Bouuaert C.C., Chalmers R. *Mariner* and the *ITm* superfamily of transposons // Microbiol. Spectrum. 2015. V. 3. № 2. MDNA3-0033-2014.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0033-2014>
 18. Shi S., Puzakov M., Guan Z. et al. Prokaryotic and eukaryotic horizontal transfer of *Sailor* (DD82E), a new superfamily of *IS630-Tc1-mariner* DNA transposons // Biology (Basel). 2021. V. 10. № 10. P. 1005.
<https://doi.org/10.3390/biology10101005>
 19. Wang S., Diaby M., Puzakov M. et al. Divergent evolution profiles of DD37D and DD39D families of *Tc1/mariner* transposons in eukaryotes // Mol. Phylogenet. Evol. 2021. V. 161. P. 107143.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2021.107143>
 20. Shao H., Tu Z. Expanding the diversity of the *IS630-Tc1-mariner* superfamily: Discovery of a unique DD37E transposon and reclassification of the DD37D and DD39D transposons // Genetics. 2001. V. 159. № 3. P. 1103–1115.
<https://doi.org/10.1093/genetics/159.3.1103>
 21. Puzakov M.V., Puzakova L.V., Cheresiz S.V. An analysis of *IS630/Tc1/mariner* transposons in the genome of a Pacific oyster, *Crassostrea gigas* // J. Mol. Evol. 2018. V. 86. № 8. P. 566–580.
<https://doi.org/10.1007/s00239-018-9868-2>
 22. Lawley J.W., Gamero-Mora E., Maronna M.M. et al. The importance of molecular characters when morphological variability hinders diagnosability: Systematics of the moon jellyfish genus *Aurelia* (Cnidaria: Scyphozoa) // Peer J. 2021. V. 9. e11954.
<https://doi.org/10.7717/peerj.11954>
 23. Dawson M.N., Sen Gupta A., England M.H. Coupled biophysical global ocean model and molecular genetic analyses identify multiple introductions of cryptogenic species // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 11968–11973.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0503811102>
 24. Луннова Н.Е. Динамика численности и биомассы популяций черноморского макрозоопланктона // Бюл. науки и практики. 2020. Т. 6. № 5. С. 74–82.
<https://doi.org/10.33619/2414-2948/54/09>
 25. Zhang H.H., Li G.Y., Xiong X.M. et al. TRT, a vertebrate and protozoan *Tc1*-like transposon: Current activity and horizontal transfer // Genome Biol. Evol. 2016. V. 8. № 9. P. 2994–3005.
<https://doi.org/10.1093/gbe/evw213>
 26. Sang Y., Gao B., Diaby M. et al. *Incomer*, a DD36E family of *Tc1/mariner* transposons newly discovered in animals // Mobile DNA. 2019. V. 10. P. 45.
<https://doi.org/10.1186/s13100-019-0188-x>
 27. Zong W., Gao B., Diaby M. et al. *Traveler*, a new DD35E family of *Tc1/mariner* transposons, invaded vertebrates very recently // Genome Biol. Evol. 2020. V. 12. № 3. P. 66–76.
<https://doi.org/10.1093/gbe/evaa034>
 28. Gao B., Zong W., Miskey C. et al. *Intruder* (DD38E), a recently evolved sibling family of DD34E/*Tc1* transposons in animals // Mobile DNA. 2020. V. 11. № 1. P. 32.
<https://doi.org/10.1186/s13100-020-00227-7>
 29. Zhang Z., Schwartz S., Wagner L.W. et al. A greedy algorithm for aligning DNA sequences // J. Computational Biol. 2000. V. 7. № 1–2. P. 203–214.
<https://doi.org/10.1089/10665270050081478>
 30. De Castro E., Sigrist C.J., Gattiker A. et al. ScanProsite: Detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins // Nucl. Acids Res. 2006. V. 34. P. W362–W365.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkl124>
 31. Buchan D.W., Minneci F., Nugent T.C. et al. Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench // Nucl. Acids Res. 2013. V. 41 (W1). P. W349–W357.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt381>
 32. Edgar R.C. MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity // Nucl. Acids Res. 2004. V. 32. P. 1792–1797.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
 33. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets // Mol. Biol. Evol. 2016. V. 33. № 7. P. 1870–1874.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>

34. Пузаков М.В., Пузакова Л.В. Распространенность, разнообразие и эволюция ДНК-транспозонов *L18* (DD37E) в геномах стрекающих (Cnidaria) // Мол. биология. 2022. Т. 56. № 3. С. 1–15
<https://doi.org/10.31857/S0026898422030120>
35. Puzakov M.V., Puzakova L.V., Cheresiz S.V., Sang Y. The *IS630/Tc1/mariner* transposons in three ctenophore genomes // Mol. Phylogenet. Evol. 2021. V. 163. P. 107231.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2021.107231>
36. Bouallègue M., Filée J., Kharrat I. et al. Diversity and evolution of *mariner*-like elements in aphid genomes // BMC Genomics. 2017. V. 18. № 1. P. 494.
<https://doi.org/10.1186/s12864-017-3856-6>
37. Benjamin B., Yves B., Corinne A.G. Assembly of the *Tc1* and *mariner* transposition initiation complexes depends on the origins of their transposase DNA binding domains // Genetica. 2007. V. 130. № 2. P. 105–120.
<https://doi.org/10.1007/s10709-006-0025-2>
38. Gomulski L.M., Torti C., Bonizzoni M. et al. A new basal subfamily of *mariner* elements in *Ceratitis rosa* and other tephritid flies // J. Mol. Evol. 2001. V. 53. № 6. P. 597–606.
<https://doi.org/10.1007/s002390010246>
39. Robertson H.M., Lampe D.J. Distribution of transposable elements in arthropods // Annual Rev. Entomol. 1995. V. 40. P. 333–357.
<https://doi.org/10.1146/annurev.en.40.010195.002001>
40. Jacobson J.W., Medhora M.M., Hartl D.L. Molecular structure of a somatically unstable transposable element in *Drosophila* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 22. P. 8684–8688.
<https://doi.org/10.1073/pnas.83.22.8684>
41. Emmons S.W., Yesner L. High-frequency excision of transposable element *Tc1* in the nematode *Caenorhabditis elegans* is limited to somatic cells // Cell. 1984. V. 36. № 3. P. 599–605.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90339-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90339-8)
42. Eide D., Anderson P. Transposition of *Tc1* in the nematode *Caenorhabditis elegans* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 6. P. 1756–1760.
<https://doi.org/10.1073/pnas.82.6.1756>
43. Guo X.M., Zhang Q.Q., Sun Y.W. et al. *Tc1*-like transposase *Thm3* of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) can mediate gene transposition in the genome of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) // G3: Genes, Genomes, Genetics. 2015. V. 5. № 12. P. 2601–2610.
<https://doi.org/10.1534/g3.115.020933>
44. Puzakov M.V., Puzakova L.V., Cheresiz S.V. The *Tc1*-like elements with the spliceosomal introns in mollusk genomes // Mol. Genet. Genomics. 2020. V. 295. № 3. P. 621–633.
<https://doi.org/10.1007/s00438-020-01645-1>
45. Capy P., Vitalis R., Langin T. et al. Relationships between transposable elements based upon the integrase-transposase domains: is there a common ancestor? // J. Mol. Evol. 1996. V. 42. № 3. P. 359–368.
<https://doi.org/10.1007/BF02337546>

Structure and Diversity of *Tc1/mariner* Transposons in the Genome of the Jellyfish *Aurelia aurita*

Yu. N. Ulupova^a, L. V. Puzakova^a, and M. V. Puzakov^{a, *}

^aFederal Research Center “Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas”,
Russian Academy of Sciences, Sevastopol, 299011 Russia

*e-mail: puzakov@ngs.ru

Transposable elements, DNA transposons and retrotransposons are DNA sequences capable of movement within the genome. It is assumed that they play one of their key roles in adaptive and evolutionary processes. One of the most studied groups of DNA transposons is the infraclass *ITm*, and in particular the superfamily *Tc1/mariner*. In this work, we considered the representation, structure, and evolution of *Tc1/mariner* DNA transposons in the jellyfish *Aurelia aurita*. It was found that the predominant proportion of *Tc1/mariner* elements of the jellyfish is represented by the *TLE* family. A new subfamily of *TLE* elements called *Aurum* has been identified. In addition, two groups of elements *VS-aura* and *VS-beplau* were found in the *Visitor* family, which are probably also separate subfamilies. Analysis of the structure and diversity of *Tc1/mariner* elements showed that at the moment *Tc1/mariner* transposons in the jellyfish genome are at the stage of degradation and elimination. Almost all elements are deleted or have structural changes, and, accordingly, do not have potentially functional copies.

Keywords: *Aurelia aurita*, transposable elements, *Tc1/mariner*, transposase, DNA transposons.

ПОЛИМОРФИЗМ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ТРЕХ ПОПУЛЯЦИЙ ЭВОРОНСКОЙ ПОЛЕВКИ ПО ДАННЫМ ИЗМЕНЧИВОСТИ КОНТРОЛЬНОГО РЕГИОНА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК

© 2023 г. И. Н. Шереметьева¹ *, И. В. Картавцева¹, Л. В. Фрисман²

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

²Институт комплексного анализа региональных проблем Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Биробиджан, 679016 Россия

*e-mail: sheremet76@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.03.2022 г.

После доработки 27.04.2022 г.

Принята к публикации 11.05.2022 г.

В результате анализа контрольного региона митохондриальной ДНК для эворонской полевки было обнаружено высокое гаплотипическое (97%) и нуклеотидное (1.53%) разнообразие. Полученные данные свидетельствуют о низком уровне генетической дифференциации популяций. При этом популяции, географически расположенные ближе, подразделены сильнее, чем удаленные. В целом наблюдается согласованность между данными изменчивости контрольного региона митохондриальной ДНК и хромосомными расами. Однако если данные хромосомного анализа указывают на сохранение более древних вариантов кариотипа хромосомной расы “эворон” в Эвороно-Чукчагирской низменности, то данные молекулярно-генетического анализа свидетельствуют в пользу сохранения наиболее древнего мт гаплотипа (106-19) в популяции Верхнебуреинской впадины (хромосомная раса “арги”).

Ключевые слова: внутривидовая изменчивость, полиморфизм, контрольный регион мтДНК, *Alexandromys evoronensis*, эворонская полевка, хромосомные расы.

DOI: 10.31857/S0016675823010101, **EDN:** EGKVYQ

Alexandromys evoronensis (Kovalskaya et Sokolov, 1980) — узкоареальный эндемик Дальнего Востока России [1–4]. В настоящее время некоторые исследователи рассматривают эворонскую полевку как полувид надвида “*maximowiczii*”. В данный надвид кроме эворонской полевки еще входят полевка Максимовича (*Alexandromys maximowiczii* Schrenck, 1858) и муйская полевка (*Alexandromys tujanensis* Orlov et Kowalskaia, 1978) [5]. Между представителями надвида “*maximowiczii*” выявлен низкий, сопоставимый с внутривидовым, уровень дифференциации по морфологическим, аллозимным и молекулярно-генетическим данным [6–12]. Несмотря на это, данные кариологического анализа и экспериментальной гибридизации свидетельствуют в пользу самостоятельности всех трех видов [6, 13–16]. До последнего времени принято было считать, что эворонская полевка обитает только в пределах Эвороно-Чукчагирской низменности [3, 6, 14, 17, 18] и ее проникновение на запад затруднено горными хребтами Буреинским, Дуссе-Алинь и Ям-Алинь [6]. Однако за последние 10 лет для эворонской полевки были

обнаружены две новые популяции за пределами Эвороно-Чукчагирской низменности: в Верхнебуреинской впадине в долине р. Ургал [19] и на северо-востоке Верхнезейской равнины в долине р. Арги [20]. Кариологический анализ показал наличие двух хромосомных рас у *A. evoronensis*: “эворон” ($2n = 38-41$, $NF = 54-59$) и “арги” ($2n = 34, 36, 37$, $NF = 51-56$) [15, 16]. К первой расе относятся полевки Эвороно-Чукчагирской низменности, ко второй — особи Верхнебуреинской впадины и Верхнезейской равнины.

Цель настоящей работы — оценить генетическое разнообразие и уровень дифференциации трех популяций эворонской полевки по данным изменчивости контрольного региона мтДНК и сопоставить полученные результаты с данными кариологического анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы образцы тканей от 43 эворонских полевок, отловленных в трех популяциях: Эвороно-Чукчагирская низменность ($n = 12$),

Верхнебуреинская впадина ($n = 17$) и Верхнезейская равнина ($n = 14$) (табл. 1). Часть из этих полевых ранее были кариотипированы [15, 16]. Образцы хранятся в УНУ “Биоресурсная коллекция ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН” (г. Владивосток). Также в анализ включены пять нуклеотидных последовательностей контрольного региона мтДНК эворонской полевки из Эворонно-Чукчагирской низменности, полученных нами ранее [8] и помещенных в GenBank (NCBI) под номерами HM135858–HM135862.

Выделение ДНК осуществляли методом солевой экстракции [21] из фиксированных в спирте тканей мышц. Подробная методика по приготовлению реакционной смеси, схема ПЦР-реакции для получения фрагмента и подготовки проб к секвенированию были описаны ранее [22]. Нуклеотидную последовательность прочитывали на автоматическом секвенаторе ABI Prizm 3130 на базе центра коллективного пользования “Биотехнология и генетическая инженерия” ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН (г. Владивосток). Редактирование и выравнивание полученных последовательностей проводили с использованием программы BioEdit 7.0.9.0 [23]. Построение филогенетических деревьев выполнено в программе MEGA X [24] методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood), достоверность кластеризации оценивали с помощью бутстрэп-анализа (1000 повторностей). Анализ максимального правдоподобия проводили с использованием эволюционной модели Тамура–Нея93 (TN93) [28] со значением эволюционной нейтральности сайтов (+I) равного 0.87 и максимальным логарифмом правдоподобия – 1970.162. Выбор эволюционной модели ML-анализа определяли по результатам модель-теста в программе MEGA X [24], по которым для модели TN93+I были получены минимальные значения байесового информационного критерия (BIC = 5001.735). Сети гаплотипов построены при помощи программы Network 10.0.0.0 с использованием метода “median joining” [25]. Показатели генетического разнообразия и дифференциации популяций рассчитаны с помощью DnaSP 6.00 [26]. Расчет статистик нейтральности (Tajima’s D и Fu’s F_s), анализ демографической и пространственной экспансии проводили в программе Arlequin 3.5 [27].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для всех 43 новых образцов эворонской полевки из трех популяций были получены последовательности контрольного региона мтДНК длиной 952 пн, все они внесены в GenBank (NCBI) под номерами OM966944–OM966984. Уровень изменчивости митохондриальных фрагментов контрольного региона эворонской полевки (число нуклеотидных замен) был достаточно высоким,

число нуклеотидных различий между отдельными гаплотипами варьировало от 0 до 28 (0.0 до 2.9%) (табл. 2) и в среднем было равно 14.42. Частоты нуклеотидов составляли $A = 29.17\%$, $T = 32.72\%$, $C = 25.55\%$ и $G = 12.56\%$. Все нуклеотидные последовательности вида (48 экз.) содержали 76 переменных сайтов (включая пять делеций), среди которых 48 были парсимониально информативны. Частота транзиций составила 0.0659, а трансверсий – 0.0095. В целом для вида обнаружено 38 гаплотипов, из них пять были описаны ранее [8]. Из обнаруженных гаплотипов один был встречен у шести особей, один – у трех, три – у двух, остальные 33 гаплотипа (86.84%) были уникальными (встречены только у одной особи). Гаплотипическое разнообразие для вида в целом было -0.97 ± 0.014 , а нуклеотидное – 0.0153 ± 0.0005 .

В выборке эворонской полевки из Эворонно-Чукчагирской низменности нуклеотидные последовательности содержали 43 переменных сайта, среди которых 16 были парсимониально информативны (табл. 3). Для этой выборки характерны самые высокие показатели как гаплотипического (100%), так и нуклеотидного (1.1%) разнообразия, обнаруженные в пределах данного вида. Все отловленные в этой низменности особи имели уникальные гаплотипы, различающиеся 1–21 нуклеотидной заменой. Среднее число парных нуклеотидных различий между гаплотипами внутри выборки составило 10.26.

Генетическое разнообразие выборки из Верхнезейской равнины было ниже, чем для Эворонно-Чукчагирской низменности. Гаплотипическое разнообразие составило здесь 97.8%, а нуклеотидное – 0.86% (табл. 3). В выборке было обнаружено 12 гаплотипов, только два из которых были встречены у двух особей. В целом нуклеотидные последовательности этой выборки имели минимальное число переменных (24) и парсимониально информативных (16) сайтов. Минимальное среднее число парных нуклеотидных различий равно 8.41, при этом число нуклеотидных различий между отдельными гаплотипами варьировало от 1 до 14.

Самые низкие значения гаплотипического (86%) и нуклеотидного (0.68%) разнообразия были отмечены в выборке Верхнебуреинской впадины (табл. 3). Так же для этой выборки характерно минимальное число парсимониально информативных (10) сайтов. При этом общее число переменных сайтов было 25. Всего для выборки Верхнебуреинской впадины обнаружено 9 гаплотипов на 17 особей. Треть этих гаплотипов была обнаружена больше чем у одной особи. Отдельные гаплотипы отличались друг от друга 1–19 нуклеотидной заменой, при этом среднее число парных нуклеотидных различий между гаплотипами внутри выборки было не намного выше, чем в выборке Верхнезейской равнины, и составило 8.68.

Таблица 1. Материал

Код популяции	Локалитет/год/координаты	№ хром. препарата	Хром. раса#/вариант кариотипа	Номер образца	Номер GenBank
Evoron	Окрест. с. Харпичан/2006/51°19' с.ш., 136°35' в.д.	2050	I/2n = 40a, NF = 57*	81-06	HM135862***
		2355	I/2n = 41a, NF = 56*	50-08	HM135861***
	Слияние рек Нимелени Амгунь/2008/52°26' с.ш., 136°34' в.д.	—		51-08	HM135860***
		—		59-08	OM966944
		—		60-08	OM966945
		2369	I/2n = 41a, NF = 56*	87-08	HM135858***
		2370	I/2n = 41a, NF = 56*	88-08	HM135859***
	Окрест. с. Полина Осипенко/2016/52°25.42' с.ш., 136°29.67' в.д.	—		11-16	OM966947
		—		23-16	OM966948
		—		34-16	OM966949
		0060	I/2n = 41a, NF = 56*	58-16	OM966950
		0064	I/2n = 40f, NF = 55*	91-16	OM966951
		0063	I/2n = 41a, NF = 56*	92-16	OM966952
		0062	I/2n = 40e, NF = 54*	93-16	OM966946
		—		94-16	OM966953
		0066	I/2n = 41a, NF = 56*	95-16	OM966954
		—		141-16	OM966955
Argi	Слияние р. Арги и Зейской протоки/2015/54°40' с.ш., 129°06' в.д.	—		2-15	OM966968
		—		3-15	OM966959
		3950	II/2n = 36a, NF = 54**	4-15	OM966969
		—		15-15	OM966956
		—		20-15	OM966960
		3991	II/2n = 36a, NF = 54**	21-15	OM966961
		3992	II/2n = 36a, NF = 54**	22-15	OM966962
		3993	II/2n = 34b, NF = 52**	23-15	OM966963
		3994	II/2n = 36c, NF = 55**	24-15	OM966964
		3995	II/2n = 36c, NF = 55**	25-15	OM966965
		3996	II/2n = 36d, NF = 55**	26-15	OM966958
		3997	II/2n = 36c, NF = 55**	27-15	OM966966
		—		28-15	OM966967
		3999	II/2n = 36c, NF = 55**	29-15	OM966957

Таблица 1. Окончание

Код популяции	Локалитет/год/координаты	№ хром. препарата	Хром. раса#/вариант кариотипа	Номер образца	Номер GenBank
Urgal	Окрест. пгт. Чегдомын/2014/ 51°05' с.ш., 132°33' в.д.	—		139-14	OM966985
		—		146-14	OM966986
	Окрест. пгт. Чегдомын/2016/ 51°05' с.ш., 132°33' в.д.	—		36-16	OM966983
		—		90-16	OM966984
	Окрест. пос. Ургал/2019/ 51°07' с.ш., 132°31' в.д.	—		36-19	OM966972
		—		37-19	OM966973
		—		70-19	OM966975
		—		72-19	OM966974
		—		73-19	OM966977
		—		74-19	OM966970
		—		75-19	OM966971
		—		80-19	OM966976
		—		82-19	OM966978
		4549	II/2n = 36c, NF = 55**	101-19	OM966979
		4554	II/2n = 37a, NF = 55**	106-19	OM966982
		4556	II/2n = 37b, NF = 55**	107-19	OM966980
		4557	II/2n = 36b, NF = 56**	108-19	OM966981

— хромосомные расы: I — “эворон”, II — “арги”; * — данные из статьи Картавцевой и др., 2021 [16]; ** — Kartavtseva et al., 2021 [15]; *** — Haring et al., 2011 [8].

Значения D Tajima для всех популяций эворонской полевки были незначимыми, но только для Верхнебуреинской впадины и Эворонно-Чукчагирской низменности они были отрицательными. Результаты теста Фу (Fu's F_s) на селективную нейтральность для всех популяций были не только отрицательными, но и высоко достоверно отличались от нуля, что может указывать на рост численности в прошлом (табл. 3).

Распределение попарных нуклеотидных различий между гаплотипами особей во всех популяциях было полимодальным (рис. 1). При этом максимальная частота для сравнений внутри популяций Эворонно-Чукчагирской низменности и Верхнезейской равнины располагается в области 9–10 (значения парных различий), а внутри популяции Верхнебуреинской впадины — в области 16–18.

Невысокие значения условного времени τ , а также низкие и статистически недостоверные значения суммы отклонений SSD свидетельствуют в пользу гипотезы роста численности с после-

дующей пространственной экспансией для всех исследуемых популяций в недавнем прошлом приблизительно в одно и то же время (табл. 3).

ML-анализ нуклеотидных последовательностей позволил построить дендрограмму и объединить последовательности в группы, характеризующие близкие гаплотипы эворонской полевки (рис. 2, а). На дендрограмме можно выделить клады, которые соответствуют трем популяциям: Эворонно-Чукчагирской низменности (Evoron), Верхнебуреинской впадины (Urgal) и Верхнезейской равнины (Argi). Исключением является гаплотип одной особи из популяции Urgal (106-19U). Этот гаплотип на дендрограмме имеет базальное расположение в единой для гаплотипов популяции Urgal и Argi кладе. С целью проведения более точной кластеризации гаплотипов эворонской полевки была построена медианная сеть (рис. 1). В целом сеть подтверждает данные, полученные при ML-анализе, показывая разделение всех гаплотипов на три группы согласно их географической приуроченности. Общих гаплотипов для

Таблица 2. Полиморфные сайты контрольного региона мтДНК эворонской полевки

	Urgal								Evoron														Argi																				
	106-19	74-19	36-19	70-19	73-19	82-19	108-19	36-16	90-16	87-08	88-08	51-08	50-08	81-06	59-08	60-08	93-16	11-16	23-16	34-16	58-16	91-16	92-16	94-16	95-16	141-16	15-15	29-15	3-15	20-15	21-15	22-15	23-15	25-15	27-15	28-15	2-15	4-15					
37*	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
38*	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
40*	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	G	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.				
41	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
73	A	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
75	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
80*	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
109	G	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	A	A	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
123	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
125	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
142	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
148	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
155	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
156	A	G	G	G	G	G	G	G	G	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.			
163*	A	G	G	T	T	G	G	G	G	.	.	.	.	G	G	.	.	.	.	.	.	.	.	G	G	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
164	A	G	.	.	.	G	G	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
171	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
193	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
195	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
196*	T	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	A	A	.	A	C	.	.	.	A	A	A	A	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
209	A	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
213	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
245	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
272	T	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
273	C	.	.	.	.	.	.	.	T	T	T	T	T	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	
274	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Таблица 2. Продолжение

		Urgal								Evoron												Argi																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
		106-19	74-19	36-19	70-19	73-19	82-19	108-19	36-16	90-16	87-08	88-08	51-08	50-08	81-06	59-08	60-08	93-16	11-16	23-16	34-16	58-16	91-16	92-16	94-16	95-16	141-16	15-15	29-15	3-15	20-15	21-15	22-15	23-15	25-15	27-15	28-15	2-15	4-15																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
278 286 288 370 411 432 617 628 630 631* 632 633 652 653 655 656 657 669 670 677 685 700 706 711 723 728	C	C	T	C	T	C	A	A	T	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

Таблица 2. Окончание

	Urgal								Evoron														Argi																	
	106-19	74-19	36-19	70-19	73-19	82-19	108-19	36-16	90-16	87-08	88-08	51-08	50-08	81-06	59-08	60-08	93-16	11-16	23-16	34-16	58-16	91-16	92-16	94-16	95-16	141-16	15-15	29-15	3-15	20-15	21-15	22-15	23-15	25-15	27-15	28-15	2-15	4-15		
737	T	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
741	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	
742	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	
743	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
748	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
751	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
754	C	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
759	C	T	T	T	T	T	T	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
760	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
761	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
762*	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
768*	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
769#	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.
770	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
771#	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
772#	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
774#	T	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
781	G	.	T	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
784	C	T	T	T	T	T	T	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
787	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
789#	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
790	A	G	G	G	G	G	G	G	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
793	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
796	C	T	T	T	T	T	T	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

— делеции, * — трансверсии.

Таблица 3. Показатели генетического разнообразия трех популяций эворонской полевки

Параметр	Evoron	Argi	Urgal
n	17	14	17
N	17	12	9
V_s	43	24	25
$k \pm S.E.$	10.26 ± 1.924	8.41 ± 1.710	8.68 ± 1.823
$h \pm S.D.$	1.000 ± 0.0202	0.9782 ± 0.027	0.8603 ± 0.02
$\pi \pm S.D.$	0.01058 ± 0.0057	0.0086 ± 0.0047	0.0068 ± 0.0038
Tajima's D (P)	-0.99 (0.165)	0.36 (0.679)	-0.51 (0.319)
Fu's F_s (P)	-9.27 (0.00)	-7.64 (0.00)	-12.60 (0.00)
Показатели пространственной экспансии			
τ	8.8	7.9	8.2
θ	2.529	3.188	2.986
M	249.86	31.24	1.73
SSD (P)	0.007 (0.40)	0.014 (0.45)	0.028 (0.80)
Показатели демографической экспансии			
τ	11.2	11.1	11.2
θ_0	0.007	0.002	0.000
θ_1	44.093	27.148	10.238
SSD (P)	0.005 (0.90)	0.008 (0.95)	0.040 (0.45)

Примечание. n — объем выборки; N — число гаплотипов; V_s — число вариабельных сайтов; k — среднее число попарных нуклеотидных различий; h — гаплотипическое разнообразие; π — нуклеотидное разнообразие; Tajima's D — коэффициент теста Таджimy; Fu's F_s — коэффициент теста Фу; τ — время экспансии в мутационных единицах; θ — мутационные параметры на начальном и конечном этапах роста численности; M — межпопуляционный обмен мигрантами; SSD — сумма квадратов отклонений между наблюдаемым и ожидаемым распределением попарных нуклеотидных различий; S.D. — стандартное отклонение; S.E. — стандартная ошибка; P — p -значение.

двух и более популяций не обнаружено. Добавление в гаплотипическую сеть в качестве внешней группы гаплотипов характерных для полевки Максимовича позволило выявить, что гаплотип 106-19 имеет базальное расположение не только внутри единой клады “Urgal” и “Argi”, но и для вида в целом. Следует сказать, что ранее при проведении кариологического анализа у данной особи (№ 4554) была обнаружена неидентифицированная перестройка [16].

Средний коэффициент генной дифференциации (G_{ST}) для выборок всех популяций составил 0.0635, что указывает на то, что только 6.35% генетической изменчивости приходится на вариацию между популяциями (табл. 4). Значение Nm (потока генов) при этом составило 3.69, что указывает на высокий уровень потока генов и низкую или среднюю генетическую дифференциацию между популяциями. Стандартный тест на гомогенность при попарном сравнении выборок из разных популяций выявил достоверный ($p < 0.05$) уровень подразделенности только внутри пар Urgal–Argi ($\chi^2 = 31.00$, $P = 0.040$) и Urgal–Evoron

($\chi^2 = 34.00$, $P = 0.049$) (табл. 4). При этом значение коэффициента G_{ST} для этих пар выборок было одинаковым и составило 0.048 и 0.052 соответственно. А значение Nm при этом не превышало 4.94. Стандартный тест на гомогенность при попарном сравнении выборок из популяций Эворон–Чукчагирской низменности (Evoron) и Верхнезейской равнины (Argi) не выявил достоверный уровень подразделенности ($\chi^2 = 31.00$, $P = 0.154$). При этом только 2.34% генетической изменчивости приходится на вариацию между популяциями, а поток генов был в два раза выше ($Nm = 10.41$). При этом следует отметить, что популяция Верхнезейской равнины географически удалена от популяций Эворон–Чукчагирской низменности больше чем популяции Верхнебуруинской впадины (табл. 4).

В результате анализа контрольного региона митохондриальной ДНК для эворонской полевки было показано высокое генетическое разнообразие для вида (гаплотипическое разнообразие равно 97%, нуклеотидное — 1.53%), несмотря на его небольшой ареал. В целом эти показатели оказа-

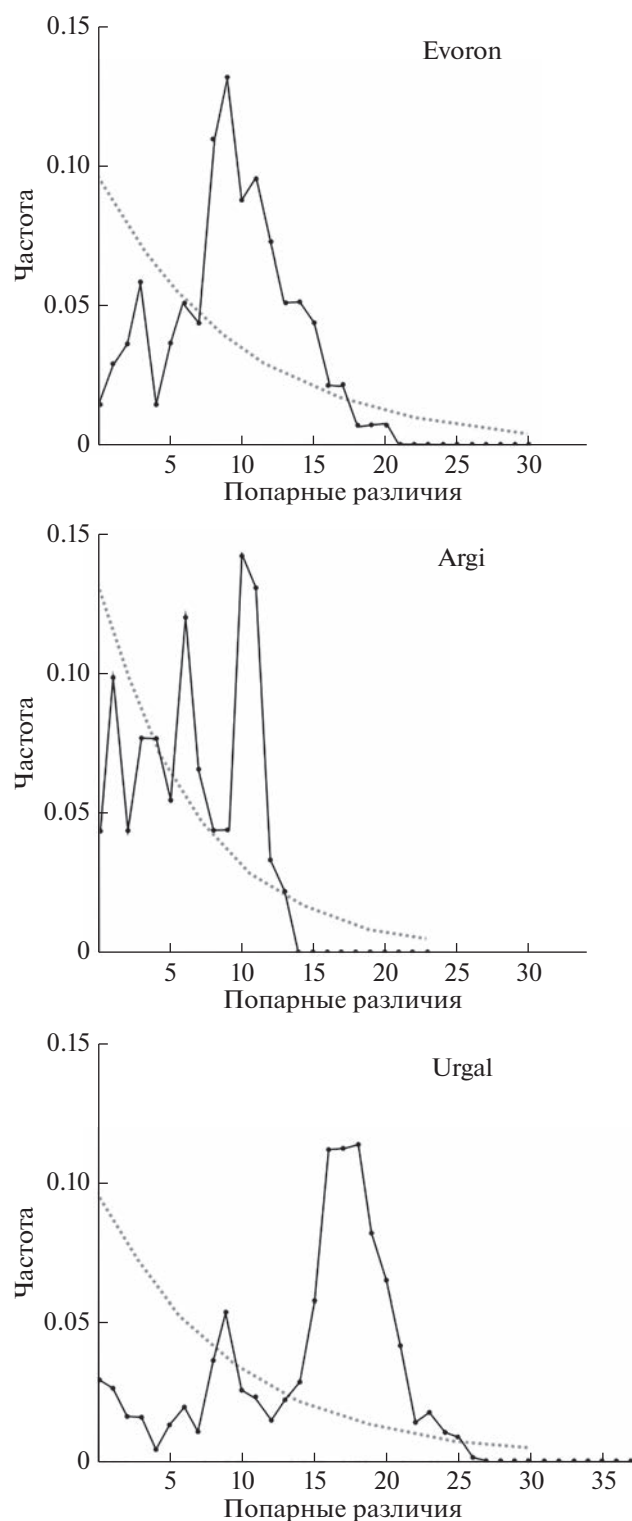


Рис. 1. Частота (ось ординат) попарных нуклеотидных различий (ось абсцисс) в трех популяциях эворонской полевки. Наблюдаемая частота обозначена сплошной линией, ожидаемое распределение — пунктирной линией.

лись значительно выше, чем аналогичные для муйской полевки (92 и 1.2%) [29], и сопоставимы с генетическим разнообразием для таких широкоареальных видов рода как полевка Максимовича

(99 и 1.41%) [22] и дальневосточная полевка (94 и 1.63%) [30]. Полученные нами данные свидетельствуют о низком уровне генетической дифференциации трех популяций. Самый большой поток

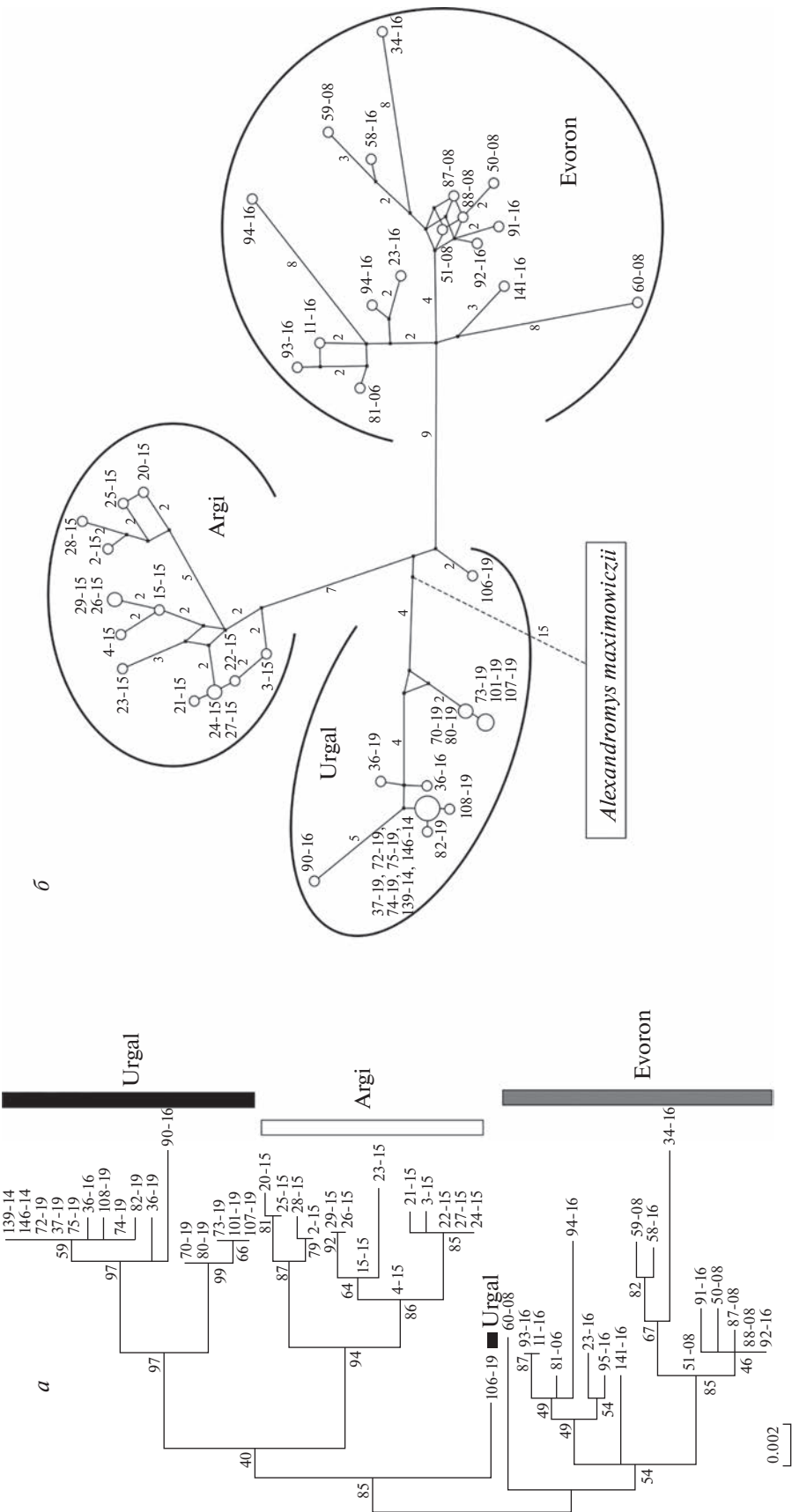


Рис. 2. ML-дендрограмма (а) и филогенетическая сеть гаплотипов мтДНК (б) эворонской полевки из трех популяций. Размеры кружков пропорциональны количеству образцов с данным гаплотипом. Образцы обозначены в соответствии с табл. 1. Цифры на ветвях сети соответствуют числу нуклеотидных замен больше 2.

Таблица 4. Показатели генетической подразделенности трех популяций эворонской полевки

Параметр	Evoron/Urgal	Evoron/Argi	Urgal/Argi
Среднее число нуклеотидных замен между популяциями	18.799	17.592	17.878
G_{ST}	0.0522	0.0234	0.0482
Nm	4.54	10.41	4.94
$\chi^2 (P)$	34.00 (0.049)	31.00 (0.154)	31.00 (0.040)
Расстояние (в км) по прямой между выборками	306	536	460

Примечание. G_{ST} — коэффициент генной дифференциации; Nm — поток генов; χ^2 — стандартный тест на гомогенность выборки; P — p -значение.

генов обнаружен между популяциями полевков Эвороно-Чукчагирской низменности и Верхнезейской равнины, которые относятся к двум разным хромосомным расам — “эворон” и “арги” соответственно. Проведенный нами анализ показал, что географически удаленные популяции имеют больше сходства (табл. 4). Две популяции эворонской полевки, относящиеся к одной хромосомной расе “арги”, на филогенетических реконструкциях — сестринские. Наибольшим генетическим разнообразием отличались полевки, отловленные в Эвороно-Чукчагирской низменности, относящиеся к хромосомной расе “эворон”. Самые низкие показатели генетического разнообразия выявлены для особей из Верхнебуреинской впадины, относящиеся к хромосомной расе “арги”, при этом именно в этой популяции обнаружен гаплотип 106-19, который имеет базальное расположение на филогенетических реконструкциях и может считаться наиболее древним для вида.

Согласно данным хромосомного анализа можно считать, что в популяции Эвороно-Чукчагирской низменности сохранились наиболее древние варианты кариотипа (с наибольшим числом акроцентрических пар хромосом — 26 и $2n = 41$), поскольку анцестральный для этого вида кариотип имел $2n = 42$ [16]. Кроме того, учитывая, что показатели генетического разнообразия выше в центральных популяциях вида, можно было бы считать популяцию Эвороно-Чукчагирской низменности исходной для вида. Однако обнаружение наиболее древнего гаплотипа (106-19) в популяции Верхнебуреинской впадины ставит это предположение под сомнение и нуждается в дальнейшем детальном исследовании.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ 15-04-03871, в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 121031500274-4 “Эволюционные аспекты формирования наземной биоты востока Азии”).

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. Gerrie R., Kennerley R. *Microtus evoronensis* (errata version published in 2017) // The IUCN Red List of Threatened Species. 2016. e.T13429A115112487. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T13429A22350421>
2. Shenbrot G.I., Krasnov B.R. An Atlas of the Geographic Distribution of the Arvicoline Rodents of the World (Rodentia, Muridae: Arvicolinae). Sofia: Pensoft, 2005. 336 p.
3. Громов И.М., Ербаева М.А. Млекопитающие фауны России и сопредельных территорий. Зайцеобразные и грызуны. СПб.: Изд. Зоол. ин-та РАН, 1995. 520 с.
4. Костенко В.А. Грызуны (Rodentia) Дальнего Востока России. Владивосток: Дальнаука, 2000. 209 с.
5. Абрамсон Н.А., Лисовский А.А. Род *Alexandromys* Ognev, 1914 // Млекопитающие России: систематико-географический справочник (Сб. трудов Зоологического музея МГУ. Т. 52) / Под ред. Павлинова И.Я., Лисовского А.А. М.: Т-во науч. изд. КМК, 2012. С. 258–365.
6. Мейер М.Н., Голенищев Ф.Н., Раджабли С.И., Саблина О.Л. Серые полевки фауны России и сопредельных территорий СПб.: Зоол. ин-т РАН, 1996. 320 с.
7. Bannikova A.A., Lebedev V.S., Lisovsky A.A. et al. Molecular phylogeny and evolution of the Asian lineage of vole genus *Microtus* (Arvicolinae, Rodentia) inferred from mitochondrial cytochrome *b* sequence // Biological J. Linnean Society. 2010. V. 99. P. 595–613. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2009.01378.x>
8. Haring E., Sheremetyeva I., Kryukov A. Phylogeny of Palearctic vole species (genus *Microtus*, Rodentia) based on mitochondrial sequences // Mammalian Bi-

- ology. 2011. V. 76. P. 258–267.
<https://doi.org/10.1016/j.mambio.2010.04.006>
9. Лисовский А.А., Оболенская Е.В. Структура краниометрического разнообразия серых полевков *Microtus* подрода *Alexandromys* // Тр. Зоол. ин-та РАН. 2011. Т. 315. № 4. С. 461–477.
https://www.zin.ru/journals/trudyzin/doc/vol_315_4/tz_315_4_lisovsky.pdf
 10. Фрисман Л.В., Картавецова И.В., Шереметьева И.Н. и др. Аллозимная дифференциация и кариотипические особенности восточноазиатских полевков Дальнего Востока России // Вестник СВНЦ ДВО РАН. 2016. № 3. С. 93–103.
 11. Lisovsky A.A., Petrova T.V., Yatsentyuk S.P. et al. Multilocus phylogeny and taxonomy of East Asian voles *Alexandromys* (Rodentia, Arvicolinae) // Zool. Scripta. 2018. V. 47. № 1. P. 9–20.
<https://doi.org/10.1111/zsc.12261>
 12. Лисовский А.А., Кадетова А.А., Оболенская Е.В. Морфологическое определение видов восточноазиатских серых полевков *Alexandromys* (Rodentia, Cricetidae) России и сопредельных территорий // Зоол. журн. 2018. Т. 97. № 1. С. 101–113.
<https://doi.org/10.7868/S0044513418010099>
 13. Ковальская Ю.М., Соколов В.Е. Новый вид полевков (Rodentia, Cricetidae, *Microtus*) из нижнего Приамурья // Зоол. журн. 1980. Т. 59. № 9. С. 1409–1416.
 14. Голенищев Ф.Н., Раджабли С.И. Новый вид серой полевки с берегов озера Эворон // Докл. Акад. наук СССР. 1981. Т. 257. № 1. С. 248–250.
 15. Kartavtseva I.V., Sheremeteyeva I.N., Pavlenko M.V. Intraspecific multiple chromosomal variations including rare tandem fusion in the russian far eastern endemic evoron vole *Alexandromys evoronensis* (Rodentia, Arvicolinae) // Comparative Cytogenetics. 2021. V. 15. № 4. P. 393–411.
<https://doi.org/10.3897/compcytogen.v15.i4.67112>
 16. Картавецова И.В., Шереметьева И.Н., Павленко М.В. Множественный хромосомный полиморфизм, хромосомной расы “эворон” эворонской полевки (Rodentia, Arvicolinae) // Генетика. 2021. Т. 57. № 1. С. 82–94.
<https://doi.org/10.31857/S0016675821010082>
 17. Картавецова И.В., Шереметьева И.Н., Немкова Г.А., Лазурченко Е.В. Хромосомные исследования полевки Максимовича *Microtus maximowiczii* Schrenk, 1858 в Норском заповеднике Амурской области и эворонской *Microtus evoronensis* Kovalsk. et Socolov, 1980 окрестностей озера Эворон Хабаровского края // Териофауна России и сопредельных территорий. М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2007. С. 188.
 18. Шереметьева И.Н., Картавецова И.В., Войта Л.Л., Тиунов М.П. Новые данные по распространению серых полевков рода *Microtus* (Rodentia: Cricetidae) на Дальнем Востоке России // Зоол. журн. 2010. Т. 89. № 10. С. 1273–1276.
 19. Шереметьева И.Н., Картавецова И.В., Васильева Т.В., Фрисман Л.В. Серые полевки рода *Alexandromys* из Верхнебуреинской впадины // Зоол. журн. 2016. Т. 95. № 5. С. 597–603.
<https://doi.org/10.7868/S0044513416050111>
 20. Шереметьева И.Н., Картавецова И.В., Васильева Т.В. Обитает ли эворонская полевка (*Alexandromys evoronensis*) на северо-востоке Верхнезейской равнины? // Зоол. журн. 2017. Т. 96. № 4. С. 477–474.
<https://doi.org/10.7868/S0044513417020076>
 21. Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. № 22. P. 4692–4693.
<https://doi.org/10.1093/nar/25.22.4692>
 22. Шереметьева И.Н., Картавецова И.В., Фрисман Л.В. и др. Полиморфизм и генетическая структура полевки Максимовича *Microtus maximowiczii* (Schrenck, 1858) (Rodentia, Cricetidae) Среднего Приамурья по данным секвенирования контрольного региона мтДНК // Генетика. 2015. Т. 51. № 10. С. 1154–1162.
<https://doi.org/10.7868/S0016675815100161>
 23. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98 // Nucl. Acids Symposium Series. 1999. V. 41. № 41. P. 95–98.
<https://doi.org/10.1021/bk-1999-0734.ch008>
 24. Kumar S., Stecher G., Li M. et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. № 6. P. 1547–1549.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
 25. Bandelt H.J., Forster P., Röhl 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>
 26. Rozas J., Ferrer-Mata A., Sánchez-DelBarrio J.C. et al. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism Analysis of large datasets // Mol. Biol. Evol. 2017. V. 34. P. 3299–3302.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>
 27. Excoffier L., Lischer H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // Mol. Ecol. Resources. 2010. № 10. P. 564–567.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
 28. Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees // Mol. Biology and Evolution. 1993. V. 10. P. 512–526.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>
 29. Картавецова И.В., Васильева Т.В., Шереметьева И.Н. и др. Генетическая изменчивость трех изолированных популяций муйской полевки *Alexandromys tujanensis* Orlov et Kovalskaja, 1978 (Rodentia, Arvicolinae) // Генетика. 2019. Т. 55. № 8. С. 920–935.
<https://doi.org/10.1134/S0016675819080071>
 30. Шереметьева И.Н., Картавецова И.В., Павленко М.В. и др. Формирование генетической структуры популяций дальневосточной полевки *Alexandromys fortis* (Rodentia, Arvicolinae) северной периферии ареала // Зоол. журн. 2022. Т. 101. № 10. С. 1173–1189.

Polymorphism and Differentiation of the Evoron Vole Three Populations according to the mtDNA Control Region Variability

I. N. Sheremetyeva^{a, *}, I. V. Kartavtseva^a, and L. V. Frisman^b

^a*Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity Far East Branch,
Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia*

^b*Institute for Complex Analysis of Regional Problems Far East Branch,
Russian Academy of Sciences, Birobidzhan, 679016 Russia*

**e-mail: sheremet76@yandex.ru*

As a result of the control region mtDNA analysis for the Evoron vole, a high haplotype (97%) and nucleotide (1.53%) diversity was found. The data obtained indicate a low level of genetic differentiation populations. At the same time, populations geographically located closer are subdivided more strongly than remote ones. In general, there is agreement between the data on the variability of the mitochondrial DNA control region and chromosome races. However, if the data of chromosomal analysis indicate the preservation of the karyotype more ancient variants in the Evoron-Chukchagir lowland (“*evoron*” chromosomal race), then the data of molecular genetic analysis testify in favor of the preservation of the most ancient mt haplotype (106-19) in the upper Bureya depression population (“*argi*” chromosomal race).

Keywords: intraspecific variability, polymorphism, mtDNA control region, *Alexandromys evoronensis*, Evoron vole, chromosome races.

ОСОБЕННОСТИ ЭВОЛЮЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК БАЙКАЛЬСКИХ ЭНДЕМИЧНЫХ ГУБОК. I. МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ ГЕНОМ *Swartschewskia khanaevi*

© 2023 г. О. О. Майкова¹, *, Д. Ю. Щербаков¹

¹Лимнологический институт Сибирского отделения
Российской академии наук, Иркутск, 664033 Россия

*e-mail: idboo8@mail.ru

Поступила в редакцию 25.02.2022 г.

После доработки 12.08.2022 г.

Принята к публикации 18.08.2022 г.

Определена нуклеотидная последовательность митохондриального генома нового вида губки из байкальского эндемичного семейства Lubomirskiidae — *Swartschewskia khanaevi*, длина которого составила 26638 пн. Филогенетический анализ на основе 14 белок-кодирующих митохондриальных генов подтвердил принадлежность описанного недавно нового вида *S. khanaevi* к роду *Swartschewskia*. Выявлено увеличение скорости накопления нуклеотидных замен в белок-кодирующих генах у видов рода *Swartschewskia* относительно других видов семейства Lubomirskiidae. Показано, что для всех исследованных митохондриальных геномов Lubomirskiidae характерно наличие большого количества и разнообразия инвертированных повторов в межгенных районах, что отличает их от других представителей класса Demospongiae.

Ключевые слова: митохондриальный геном, скорость эволюции, межгенные районы, молекулярная филогения, *Swartschewskia khanaevi*.

DOI: 10.31857/S0016675823020054, **EDN:** KXIZXI

Тип Porifera насчитывает более чем 8000 видов губок, из которых только 238 видов являются пресноводными и относятся к классу Demospongiae, отряду Spongillida [1]. За последние 50 лет было описано около 50 новых для науки видов пресноводных губок, из которых 15 — из Палеарктического региона [1, 2]. Одним из центров видового разнообразия пресноводных губок в Палеарктике является озеро Байкал. В Байкале губки представлены двумя семействами — космополитным Spongillidae и эндемичным Lubomirskiidae. В настоящее время Lubomirskiidae насчитывают 14 видов (4 рода) [2], включая недавно описанный новый вид [3]. Дивергенция общего предка Lubomirskiidae и предка космополитного вида *Ephydatia muelleri* [4, 5] произошла около 10 млн лет назад, в то время как современные литоральные виды образовались совсем недавно — около 0.15–1.5 млн лет назад [5]. Особенностью байкальских эндемичных губок является большой размах морфологического разнообразия на фоне малых межвидовых генетических расстояний [4, 5]. Исключением является род *Swartschewskia*, представители которого образуют генетически хорошо обособленную кладу и имеют характерную морфологию, одно-

значно отличающую их от представителей других родов семейства Lubomirskiidae [3].

Перечисленные выше эволюционные особенности байкальских эндемичных губок делают их интересным, но в то же время и сложным объектом для исследования процессов видообразования. До сих пор филогенетические взаимоотношения внутри семейства Lubomirskiidae окончательно не разрешены. Ранее были проведены молекулярно-генетические исследования филогении Lubomirskiidae на основе нуклеотидных последовательностей генов рРНК, ITS, интрона гена тубулина и участка митохондриального гена *cox1*. С помощью анализа участка гена *cox1* [6, 7], гена *18S* рРНК [8] и ITS-районов рДНК [4] было показано, что все эндемичные байкальские губки объединяются в одно монофилетичное семейство Lubomirskiidae. Последовательности генов *cox1* и *18S* рРНК губок не позволили разделить виды родов *Baikalospongia* и *Lubomirskia*, при этом наибольшие генетические расстояния обнаружены между видом *Swartschewskia papyracea* [6, 7] и другими Lubomirskiidae. Филогенетический анализ на основе последовательности интрона гена тубулина подтвердил монофилетичность Lubomirskiidae вместе с космополитным видом *Spongilla lacustris*, и было выска-

зано предположение о дивергенции *S. papyracea* и общего предка раньше всех из ныне живущих проанализированных байкальских губок [6, 8].

Таким образом, ни один из использованных ранее генетических маркеров не обладает достаточной вариабельностью для разрешения филогенетических отношений внутри семейства Lubomirskiidae. С целью проведения эволюционных и филогенетических исследований байкальских губок ранее были определены нуклеотидные последовательности митохондриальных геномов шести видов Lubomirskiidae [5, 9]. Обнаружено, что скорость эволюции мтДНК байкальских губок в 20–60 раз ниже, чем у млекопитающих и сопоставима с таковой у растений и кораллов [10]. Нуклеотидные последовательности всех белок-кодирующих митохондриальных генов не обладают достаточным набором замен, позволяющим разделить виды внутри родов, как это видно на примере рода *Baikalospongia* [9]. При этом особый интерес с точки зрения понимания процессов видообразования вызывает вид *S. papyracea*, у которого наблюдается ускорение накопления нуклеотидных замен в белок-кодирующих генах мтДНК относительно других видов Lubomirskiidae практически в два раза [5]. Характерно ли такое ускорение только для этого вида, или это является особенностью рода *Swartchewskia* в целом, до недавнего времени мы не могли ответить на этот вопрос, пока не был найден и описан новый представитель этого рода – вид *Swartchewskia khanaevi* [3].

На фоне замедленной скорости эволюции митохондриальной ДНК байкальских губок обнаружена повышенная скорость вставок/делеций инвертированных повторов, обнаруженных в большом количестве в межгенных районах митохондриальных геномов Lubomirskiidae. Именно наличием множества инвертированных повторов в межгенных областях обусловлен самый большой размер митохондриального генома у байкальских губок среди всех остальных представителей Demospongia. На примере генома *L. baikalensis* была предложена классификация инвертированных повторов, определено число копий и место расположения каждого из них в геноме [10]. Но до сих пор не ясно, имеется ли какая-то закономерность в распределении этих повторов среди видов Lubomirskiidae, специфичен ли набор таких инвертированных повторов на уровне рода.

В рамках данного исследования была определена нуклеотидная последовательность митохондриального генома нового вида *S. khanaevi*. Проведен филогенетический анализ на основе последовательностей 14 белок-кодирующих генов, а также исследованы некоторые закономерности эволюции межгенных районов мтДНК байкальских губок.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образец *S. khanaevi* был отобран на глубине 10 м в районе пролива Ольхонские ворота (52°59'25.00" N, 106°55'32.43" E) 9 сентября 2016 г. Этому образцу был присвоен номер BS1741-1 в коллекции байкальских губок лаборатории Аналитической биорганической химии Лимнологического института СО РАН (Иркутск, Россия). Видовая идентификация была проведена с помощью морфологического анализа спикул и скелета, используя световой электронный микроскоп Olympus CX22. Препараты спикул и скелета были приготовлены, как это описано ранее [11]. Суммарная ДНК была выделена из ткани губки путем экстракции с помощью фенол-хлороформным методом с использованием лизирующего СТАВ-буфера [12]. Митохондриальный геном амплифицирован и секвенирован по ранее опубликованной методике [5]. Фрагменты мтДНК были собраны при помощи программы MAFFT v. 6.882 [13].

Для филогенетического анализа, проведенного с помощью программы MrBayes v. 3.2.1 [14], были использованы нуклеотидные последовательности 14 белок-кодирующих генов мтДНК, для которых с целью определения наиболее подходящей модели нуклеотидных замен был использован параметр “mixed”. Марковские цепи (MCMC) были запущены дважды (параметр по умолчанию) по 20 000 000 генераций. Для подсчета относительных скоростей эволюции белок-кодирующих последовательностей были использованы дополнительные параметры: “constraint ingroup = 2-; prset topologypr = constraints(ingroup); prset brlenspr = clock:uniform; prset clockvarpr = igr”. С помощью параметров “constraint ingroup = 2-; prset topologypr = constraints(ingroup)” мы задали вид *E. muelleri* в качестве внешней группы по отношению к Lubomirskiidae. Параметры “prset brlenspr = clock:uniform; prset clockvarpr = igr” использовались для определения расслабленной модели часов, где модель нуклеотидных замен GTR была определена как наиболее вероятная для анализируемого набора митохондриальных белок-кодирующих генов с помощью программы IQ-TREE v.1.6.12 [15]. При таком наборе параметров в MrBayes v. 3.2.1 формируется файл со сводной статистикой параметров ветвей и узлов, который выводится с помощью команды “sump”. Этот файл содержит информацию об относительных скоростях накопления нуклеотидных замен для каждой линии (таксоне).

Статистический анализ распределения длин ветвей, их сравнение и иллюстрирование были проведены с помощью программы BEAST, а также скриптов на языках R и Python, доступных на <https://github.com/dysh/>. Дополнительно для сравнения были добавлены последовательности митохондриальных белок-кодирую-

ших генов морской губки *Geodia neptuni* (номер GenBank AY320032.1).

Для филогенетического анализа были использованы последовательности 14 белок-кодирующих генов ранее опубликованных митохондриальных геномов губок семейства Lubomirskiidae: *Rezinkovia echinata* (JQ302309), *S. papyracea* (JQ302308), *B. intermedia* (KU324767), *B. intermedia profundalis* (JQ302310), *L. baicalensis* (GU385217), *B. bacillifera* (KJ192328), и представителя космополитного семейства Spongillidae — *E. muelleri* (NC_010202) в качестве аутгруппы. Поиск инвертированных повторов проводили с помощью программы Palindrom (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/palindrome>) с параметрами поиска: минимальная длина последовательности инвертированного повтора — 6 пн, максимальная — 100 пн, максимальное расстояние между повторяющимися регионами — 10 пн.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Митохондриальный геном *S. khanaevi* депонирован в базу данных NCBI (GenBank) под номером MT982118, его длина составила 26638 пн. Геном содержит два гена рРНК (*rnl*, *rns*), 23 гена тРНК и 14 белок-кодирующих генов (*atp6*, *atp8–9*, *cob*, *nad1–6*, *4L*, *cox1–3*). Все гены имеют одинаковое направление транскрипции, общий А+Т состав равен 54.07% (48.86–72%). Порядок расположения генов по сравнению с другими митохондриальными геномами байкальских эндемичных губок неизменен [16]. Нуклеотидные последовательности короткого фрагмента внутри гена малой субъединицы рРНК, часть межгенного региона между генами *nad4* и *trnE*, включая ген *trnH*, не были определены из-за возможного присутствия в этих местах инвертированных повторов, затрудняющих амплификацию. Предполагаемая общая длина этих последовательностей составила 719 пн на основании сравнения с последовательностью вида *L. baicalensis*.

На филогенетическом древе (рис. 1) *S. khanaevi* и *S. papyracea* образуют единую кладу, так же как и представители рода *Baikalospongia* (*B. bacillifera*, *B. intermedia* и *B. intermedia profundalis*). Большая длина ветвей в кладе *Swartschewskia* может быть вызвана либо ускоренной фиксацией замен у этих двух видов, либо наоборот — замедлением этой скорости у других видов Lubomirskiidae. Для того, чтобы выбрать одну из этих гипотез, мы сравнивали скорости молекулярной эволюции у байкальских видов со скоростью у *E. muelleri* относительно морской губки *G. neptuni*. Для этого сравнивали распределение длин филогенетических путей от OTU, входящих в группы, до общего предка этой группы и *E. muelleri*. Выборку производили из бутстрепных реплик второй половины поиска BEAST, то есть после достижения равновесия. В процессе поиска топология дерева была зафиксиро-

вана по образцу оптимальной полностью разрешенной топологии, полученной при филогенетическом анализе того же набора данных. Результаты этого анализа подтверждают гипотезу об ускорении эволюции у *Swartschewskia* и об отсутствии достоверных различий между *E. muelleri* и байкальскими губками кроме *Swartschewskia* (рис. 2).

С помощью байесовского анализа подтверждено достоверное ускорение фиксации нуклеотидных замен в белок-кодирующих генах у *S. khanaevi* (95% highest posterior density (HPD) interval >1 (2.105962), variance >1 (4.117008)) относительно других байкальских эндемичных губок и космополитного вида *E. muelleri*, что также характерно и для другого представителя этого же рода — *S. papyracea* [5]. Таким образом, повышенная скорость накопления нуклеотидных замен в белок-кодирующих митохондриальных генах является характерной особенностью рода *Swartschewskia*.

Ранее уже сообщалось о значительном ускорении эволюции митохондриальных последовательностей у филогенетически достаточно отдаленных видов, относящихся к разным отрядам класса Demospongiae [17], у байкальских же губок это наблюдается для филогенетически близкородственных видов внутри одного семейства. Ранее было показано, что ускорение накопления нуклеотидных замен приводит к большей скорости диверсификации видов [18]. Можно предположить, что хорошая морфологическая и генетическая обособленность видов рода *Swartschewskia* связана с увеличением скорости фиксации нуклеотидных замен в геноме. Обнаружение у представителей Lubomirskiidae различных стратегий молекулярной эволюции делает это семейство еще более интересным для исследования микроэволюционных процессов, что и будет более подробно изучено в следующей работе.

Протяженность межгенных районов у *S. khanaevi* составляет 8237 пн, или 31% от общей длины генома. Байкальские эндемичные губки обладают самым протяженным митохондриальным геномом среди других представителей класса Demospongiae, длина которого варьирует от 26518 до 28958 пн [9, 10], тогда как у большинства губок класса Demospongiae — от 16000 до 25000 пн [17, 19]. Такое отличие по длине генома у байкальских губок связано с удлинением некодирующих последовательностей, которые составляют от 28.6 до 33.6% от общего размера генома по сравнению с 2–24% у космополитических и морских губок [17]. Вариативность межгенных районов мтДНК байкальских губок обусловлена в большей степени инвертированными повторами, скорость вставок и делеций которых в 4–4.5 раза превышает скорость накопления одиночных нуклеотидных замен [10, 20]. Вообще, распространение инвертированных повторов характерно для мтДНК губок класса Demospongiae, которые обнаружены в разных фи-

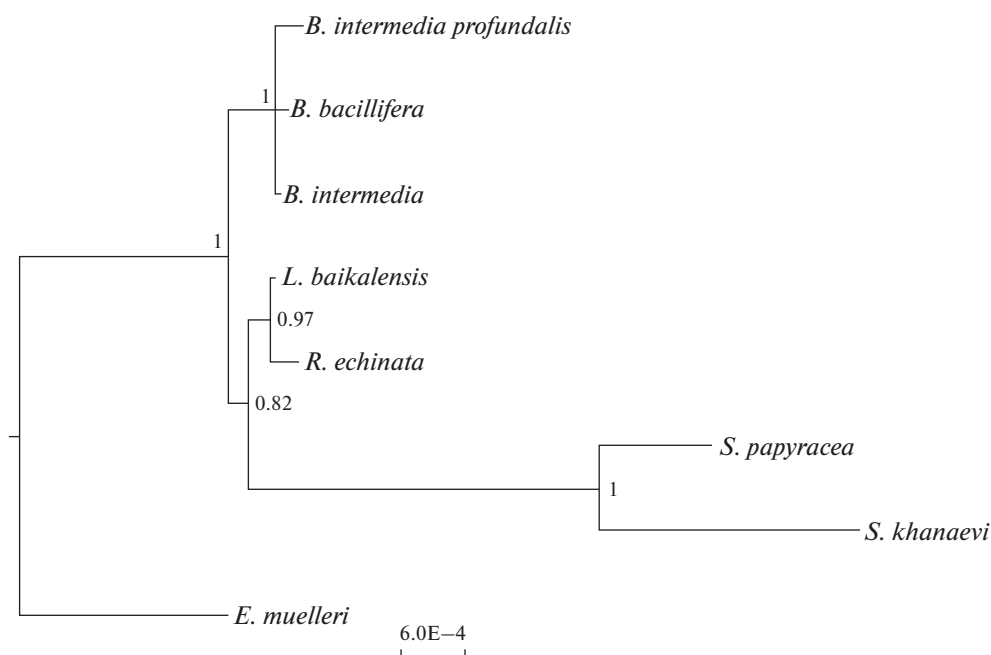


Рис. 1. Байесовское дерево, основанное на 14 белок-кодирующих генах мтДНК. Цифры возле узлов означают постериорные вероятности.

логенетических линиях. Например, у *S. domuncula* обнаружено около 700 прямых повторов с преобладающей длиной в 12–15 пн, 100 инвертированных повторов (самый протяженный составляет 44 пн) и 10 палиндромов [21]. Тем не менее, мтДНК большинства представителей класса Demospongiae, у которых длина межгенных районов варьирует от 340 до 2134 пн, либо вообще не содержат инвертированные повторы, либо имеют короткие G+C-богатые шпильки. Предполагается, что внедрение и распространение инвертированных повторов среди губок происходило неравномерно – одни семейства губок более восприимчивы к их внедрению (Keratosia и Muxospongiae), другие менее (Hexactinellida и Homoscleromorpha). Вероятнее всего внедрение таких элементов происходило независимо и неоднократно в течение эволюции губок [10, 21, 22].

Ранее Д.В. Лавровым [10] были описаны и классифицированы инвертированные повторы в межгенных районах мтДНК *Lubomirskia baikalensis*. Мы провели поиск и анализ этих повторов в межгенных районах семи митохондриальных геномов байкальских эндемичных губок и обнаружили: у *L. baikalensis* – 197 инвертированных повторов, у *R. echinata* – 175, у *B. bacillifera* – 137, у *B. intermedia* – 157, у *B. intermedia profunda* – 168, у *S. papyracea* – 141 и у *S. khanaevi* – 144. Чтобы исследовать закономерность наследования инвертированных повторов, мы провели их сравнительный анализ. Поскольку поиск инвертированных повторов велся по комплементарным нуклеотидным последовательностям в шпильчатой структуре (ножке), то

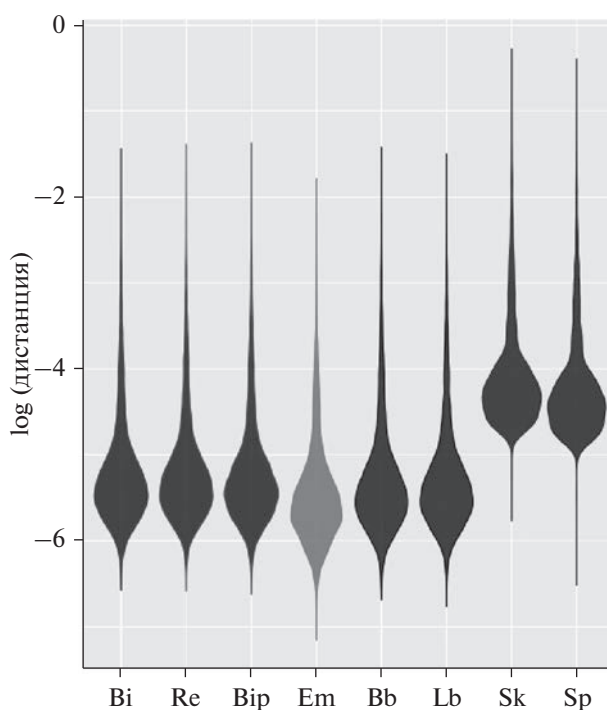


Рис. 2. Распределение длин ветвей на основе 14 белок-кодирующих митохондриальных генов. Названия видов губок: Bi – *B. intermedia*, Re – *Rezinkovia echinata*, Bip – *B. intermedia profunda*, Em – *Ephydatia muelleri*, Bb – *B. bacillifera*, Lb – *Lubomirskia baikalensis*, Sk – *S. khanaevi*, Sp – *S. papyracea*. Виды байкальского эндемичного семейства Lubomirskiidae показаны черным цветом, вид космополитного семейства Spongilidae – серым.

Таблица 1. Инвертированные повторы в мтДНК видов Lubomirskiidae согласно предложенной ранее их классификации [10]

Вид	H1	H2	H3	H4	H6	H7	Общее количество инвертированных повторов
<i>L. baikalensis</i>	13	18	7	7	16	7	197
<i>R. echinata</i>	16	14	0	7	14	14	177
<i>B. bacillifera</i>	5	4	5	4	11	13	144
<i>B. intermedia</i>	5	5	5	0	13	17	163
<i>B. intermedia profundalis</i>	0	0	5	0	9	20	168
<i>S. papyracea</i>	1	0	0	0	16	18	145
<i>S. khanaevi</i>	1	2	1	0	15	18	143
<i>E. muelleri</i> (Spongillidae)	0	0	0	0	0	7	59

есть последовательность петель не учитывалась, то из поиска мы исключили те шпильчатые структуры, которые по различающейся последовательности петель были описаны Д.В. Лавровым и отнесены к разным типам. Для сравнения состава шпильчатых структур был выбран космополитный пресноводный вид *Ephydatia muelleri*, который является ближайшим сестринским видом по отношению к Lubomirskiidae. Результат сравнения представлен в табл. 1.

Из табл. 1 видно, что у всех байкальских губок в митохондриальном геноме обнаружены инвертированные повторы H6 и H7, остальные присутствовали не во всех геномах. Наименьшее разнообразие повторов найдено у глубоководного вида *B. intermedia profundalis*. Таким образом, мы видим, что митохондриальный геном губок семейства Lubomirskiidae обладает повышенной восприимчивостью к внедрению инвертированных повторов по сравнению с ближайшим предковым космополитным видом *E. muelleri*. Каких-то значимых отличий в количестве и распределении разных типов инвертированных повторов среди представителей Lubomirskiidae не выявлено. Наибольшее сходство по количеству каждого типа инвертированных повторов наблюдается у видов рода *Swartschewskia*.

Таким образом, определена нуклеотидная последовательность полного митохондриального генома описанного недавно нового вида байкальской эндемичной губки *S. khanaevi*. Филогенетический анализ на основе последовательностей белок-кодирующих митохондриальных генов подтвердил принадлежность этого вида к роду *Swartschewskia*. Вероятнее всего, хорошую морфологическую и генетическую обособленность этого рода внутри Lubomirskiidae можно объяснить в большей степени повышенной скоростью молекулярной эволюции, а не более ранней дивергенцией видов *Swartschewskia* от общего предка байкальских губок. Показано, что все проанализированные нами виды данного семейства содержат в межгенных областях

мтДНК повышенные (по сравнению с космополитным ближайшим предком *E. muelleri*) количество и разнообразие инвертированных повторов.

Работа выполнена в рамках бюджетных тем ЛИН СО РАН: № 121032300196-8 “Генетика сообществ байкальских организмов: структура генофонда, стратегии консервации”, № 121032300224-8 “Исследование трансформаций состояния водоемов и водотоков Восточной Сибири в сезонных и долговременных аспектах в контексте изменений климата, геологической среды и антропогенных нагрузок”.

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. Manconi R., Pronzato R. Phylum Porifera // Ecology and General Biology: Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates. Amsterdam: Elsevier, 2015. P. 133–157. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385026-3.00008-5>
2. Manconi R., Pronzato R. Phylum Porifera // Keys to Palaearctic Fauna: Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates. Amsterdam: Elsevier, 2019. P. 45–87. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385024-9.00003-4>
3. Bukshuk N.A., Maikova O.O. A new species of Baikal endemic sponges (Porifera, Demospongiae, Spongillida, Lubomirskiidae) // ZooKeys. 2020. V. 906. P. 113–130. <https://doi.org/10.3897/zookeys.906.39534>
4. Iskovich V., Gontcharov A., Masuda Y. et al. Ribosomal ITS sequences allow resolution of freshwater sponge phylogeny with alignments guided by secondary structure prediction // J. Mol. Evol. 2008. № 67. P. 608–620.
5. Maikova O., Khanaev I., Belikov S. et al. Two hypotheses of the evolution of endemic sponges in Lake Baikal (Lubomirskiidae) // J. Zoolog. Syst. Evol. Res. 2015. V. 53. P. 175–179.
6. Schroder H.C., Efremova S.M., Iskovich V.B. et al. Molecular phylogeny of the freshwater sponges in Lake

- Baikal // J. Zool. Syst. Evol. Research. 2002. V. 40. P. 1–7.
7. Yakhnenko A.S., Itskovich V.B. Analysis of mtDNA variability in closely related Baikal sponge species for new barcoding marker development // Limnology. 2020. V. 21. № 1. P. 49–57.
<https://doi.org/10.1007/s10201-019-00599-7>
 8. Itskovich V., Belikov S., Efremova S. et al. Phylogenetic relationships between freshwater and marine Haplosclerida (Porifera, Demospongiae) based on the full length 18S rRNA and partial COXI gene sequences // Porifera Research Biodiversity, Innovation and Sustainability. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2007. P. 1–9.
 9. Maikova O., Sherbakov D., Belikov S. The complete mitochondrial genome of *Baikalospongia intermedia* (Lubomirskiidae): description and phylogenetic analysis // Mitochondrial DNA. Part B: Resources. 2016. V. 1. P. 569–570.
<https://doi.org/10.1080/23802359.2016.1172273>
 10. Lavrov D.V. Rapid proliferation of repetitive palindromic elements in mtDNA of the endemic Baikalian sponge *Lubomirskia baicalensis* // Mol. Biol. Evol. 2010. V. 27. P. 757–760.
 11. Ефремова С.М. Губки (Porifera) // Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна. Т. 1. Озеро Байкал. Кн. 1. Новосибирск: Наука. 2001. С. 179–192.
 12. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
 13. Katoh K., Toh H. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program // Brief Bioinform. 2008. V. 9. P. 286–298.
 14. Ronquist F., Huelsenbeck J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // Bioinformatics. 2003. V. 19. P. 1572–1574.
 15. Kalyaanamoorthy S., Minh B.Q., Wong T.K.F. et al. Model Finder: Fast Model Selection for Accurate Phylogenetic Estimates // Nature Methods. 2017. V. 14. P. 587–589.
 16. Lavrov D.V., Maikova O.O., Pett W. et al. Small inverted repeats drive mitochondrial genome evolution in Lake Baikal sponges // Gene. 2012. V. 505. P. 91–99.
 17. Wang X., Lavrov D.V. Seventeen new complete mtDNA sequences reveal extensive mitochondrial genome evolution within the Demospongiae // PLoS One. 2008. V. 3. № 7. P. 1–11.
 18. Eo S.H., De Woody J.A. Evolutionary rates of mitochondrial genomes correspond to diversification rates and to contemporary species richness in birds and reptiles // Proc. Biol. Sci. 2010. V. 277. P. 3587–3592.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2010.0965>
 19. Gazave E., Lapebie P., Renard E. et al. Molecular phylogeny restores the supra-generic subdivision of homoscleromorph sponges (Porifera, Homoscleromorpha) // PLoS One. 2010. V. 5. № 12. e14290.
 20. Майкова О.О., Степнова Г.Н., Беликов С.И. Вариабельность некодирующих последовательностей митохондриальной ДНК губок семейства Lubomirskiidae // ДАН (Биохимия и Биофизика). 2012. Т. 442. № 5. С. 709–711.
 21. Lukic-Bilela L., Brandt D., Pojskic N. et al. Mitochondrial genome of *Suberites domuncula*: Palindromes and inverted repeats are abundant in non-coding regions // Gene. 2008. V. 412. P. 1–11.
 22. Erpenbeck D., Voigt O., Wörheide G. et al. The mitochondrial genomes of sponges provide evidence for multiple invasions by repetitive hairpin-forming elements (RHE) // BMC Genomics. 2009. V. 10. № 591. P. 1–14.

Mitochondrial DNA Evolution Trends of Baikal Endemic Sponges.

I. Mitochondrial Genome of *S. khanaevi*

O. O. Maikova^a, * and D. Yu. Sherbakov^a

^aLimnological Institute, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia

*e-mail: idboo8@mail.ru

The nucleotide sequence of the mitochondrial genome of a new species of sponge from the Baikal endemic family Lubomirskiidae — *Swartschewskia khanaevi* was determined, the length of which was 26 638 bp. An increase in the rate of accumulation of nucleotide substitutions in protein-coding genes from 2 to 3 times relative to other species of sponges of the Lubomirskiidae family was revealed. On the phylogenetic tree, the species *S. khanaevi* clusters with another representative of the genus *Swartschewskia*. It was shown that all studied mitochondrial genomes of Lubomirskiidae are characterized by the presence of a large number and diversity of inverted repeats in intergenic regions, which distinguishes them from other members of the Demospongiae class.

Keywords: mitochondrial genome, evolution rate, intergenic regions, molecular phylogeny, *Swartschewskia khanaevi*.

ДОЛГОВРЕМЕННАЯ И СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА ИНВЕРСИОННОГО
ПОЛИМОРФИЗМА МАЛЯРИЙНОГО КОМАРА *Anopheles messeae* Fall.
(Diptera: Culicidae) В ПОПУЛЯЦИИ ЦЕНТРАЛЬНОЙ ЧАСТИ
ВИДОВОГО АРЕАЛА (ЗАПАДНАЯ СИБИРЬ, ТОМСКАЯ ОБЛАСТЬ)

© 2023 г. А. К. Сибатаев¹, И. Э. Вассерлауф¹, К. Е. Усов¹,
С. С. Алексеева¹, Г. М. Абылкасымова², В. Н. Стегний^{1, *}

¹Томский государственный университет, Томск, 634050 Россия

²Институт генетики и физиологии, Алматы, 050060 Казахстан

*e-mail: stegniy@res.tsu.ru

Поступила в редакцию 14.03.2022 г.

После доработки 12.05.2022 г.

Принята к публикации 31.05.2022 г.

Была проведена оценка уровня генетической изменчивости с 1974 по 2020 гг. в популяции малярийного комара *Anopheles messeae* Fall. п. Коларово (Томская обл.) на основе цитогенетического анализа политемных хромосом. Анализ динамики инверсионного полиморфизма малярийного комара *Anopheles messeae* Fall. в период с 1974 по 2020 гг. по частотам инверсионных вариантов хромосом и гамет в популяции п. Коларово показал замещение “северных” вариантов в период 90-х гг. прошлого столетия “южными” вариантами и стабилизацию этих перемен до 2020 г. Была выявлена корреляция частотного распределения хромосомных инверсий с 1972 по 2020 гг. с годовой температурой, включающей в себя полугодовую среднюю апрель–сентябрьскую и полугодовую среднюю октябрь–мартовскую температуру. Полученные результаты позволили вскрыть характер динамических процессов в течение длительного периода в связи с потеплением климата. Пространственно-временная стационарность (динамическая устойчивость) адаптивного инверсионного полиморфизма — свидетельство отсутствия тенденций к видообразованию.

Ключевые слова: *Anopheles messeae*, хромосомный полиморфизм, инверсии, малярийные комары, популяционная генетика.

DOI: 10.31857/S0016675823020121, **EDN:** KYGMNK

Малярийные комары (Diptera, Culicidae) являются одним из представителей гнуса и переносчиком разнообразных трансмиссивных болезней, одной из которых является наиболее опасная — малярия [1–4]. В настоящее время эта проблема становится актуальной, что связано не только с потеплением климата, но и с миграцией народов из южных регионов [1, 5, 6] в Россию. В связи с этим необходимо проводить популяционно-генетический мониторинг в популяциях малярийных комаров [7]. Одним из широко распространенных видов малярийных комаров является *Anopheles messeae* представитель комплекса “maculipennis”, занимающий гигантский ареал, охватывающий разнообразные ландшафтно-климатические зоны Палеарктики [8].

В популяциях *An. messeae* выявлено пять широко распространенных по ареалу инверсий, существующих в гетеро- и гомозиготном состояниях [9]. Эти инверсии расположены: две в половой хромосоме (XL₁, XL₂) и по одной в аутосомах 2R₁, 3R₁,

3L₁ [10]. Анализ частот встречаемости отдельных инверсий, проведенный в 1974–1979 гг., показал наличие клинальных закономерностей распределения инверсий. Для инверсий XL₁ и 3R₁ характерна четкая (для 3L₁ несколько менее четкая) клинальная изменчивость частот в долготном направлении, а для инверсии 2R₁ — в широтном [7]. *An. messeae* отличается высокой адаптивной пластичностью, занимает всю Центральную и Северную Европу, прекрасно переносит резко континентальный климат Сибири и Казахстана. На востоке распространение *An. messeae* ограничено Зейско-Буреинской низменностью, северная граница ареала совпадает с 65° с.ш., а южная проходит на уровне 42° ю.ш. [8]. В пределах ареала сильно изменяются сроки зимовки и длительность диапаузы, фенологические показатели [11]. Число летних генераций у вида колеблется от двух на севере ареала до пяти-семи на юге. Естественно, что в разных географических районах изменяются и экологические усло-

вия существования как личиночных, так и имагинальной стадии развития [8]. Границы ареала *An. messeae* в основном определяются климатическими факторами [12]. Исходя из имеющихся доказательств адаптивной природы полиморфизма [13, 14], было высказано предположение [10, 15], что инверсионные генокомплексы играют важную роль в видовой системе генетической адаптации *An. messeae* [16–21]. В большинстве случаев инверсионный полиморфизм структурно организован по ареалу и частично коррелирует с градиентами климатических факторов среды обитания [14, 22–24].

Многолетние наблюдения за распределением инверсий комаров в 70-х гг. XX в. в популяции центральной части ареала (Западная Сибирь, Томск) показали наличие межгодовых [7] и сезонных [17, 25, 26] флуктуаций частот инверсий, коррелирующих с периодическим изменением условий обитания и особенно температурных режимов.

Цель настоящей работы — анализ результатов долговременного и сезонного мониторинга генетической структуры в популяции п. Коларово Томской обл. в плане оценки адаптивного характера генетической изменчивости в связи с потеплением климата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для работы послужили личинки *An. messeae* четыре возраста, собранные в Томской обл. (п. Коларово, 59°19'45" N 84°56'53" E) в период генерации комаров с мая по август 2020 г. включительно (29.05.2020, 21.06.2020, 29.07.2020, 08.08.2020).

Личинок фиксировали спирт-уксусной смесью 3 : 1 (раствор Карнуа). Готовили лактоацеторсеиновые препараты по модифицированной методике [9]. Цитогенетический анализ инверсионного состава малярийных комаров проводили по картам хромосом *An. messeae* [7, 10]. Сравнивали частоты инверсий в популяциях методом χ^2 , уровень значимости $p = 0.05$.

Для анализа температуры были взяты параметры годового хода температуры, апрель—сентябрь и октябрь—март с 1971 по 2020 гг. [27]. Годовой ход температуры воздуха с апреля по сентябрь оказывает влияние во время размножения комаров *An. messeae*, а температура с октября по март оказывает влияние во время зимовки имаго. Температурные данные холодного периода получены сложением средних температур октября—декабря 1971 г. и января—марта 1972 г. и т.д. (рис. 1).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полученные данные по уровню инверсионного полиморфизма *An. messeae* в популяции п. Ко-

ларово Томской обл. в 2020 г. показывают значительное изменение частот инверсий по сравнению с данными, полученными в 70-х гг. XX в. (рис. 2).

В популяции комаров *An. messeae* в 2020 г. по XL-хромосоме в июне гетерозиготность (XL_{01}) резко возросла за счет снижения частоты гомозигот XL_{00} . Остальные хромосомы (2R, 3R, 3L) сохраняли равновесные частоты гомо- и гетерозигот в течение всего летнего периода (табл. 1).

Анализ динамики инверсионного полиморфизма малярийного комара *Anopheles messeae* в период с 1974 по 2020 гг. показал следующие результаты:

Х хромосома — XL плечо. Динамика частот инверсионных вариантов XL хромосомы варьирует в течение анализируемого периода, было выявлено увеличение доли особей XL_0 с $3.6 \pm 1.5\%$ в 1974 г. до $35.2 \pm 2.3\%$ в 2020 г. ($p < 0.05$) и уменьшение особей с XL_1 . В период 90-х годов XX века менялось соотношение доли особей с инверсиями XL_0 и XL_1 (рис. 2,а). Анализ частот инверсионных вариантов хромосомы XL, показал резкое снижение доли вариантов XL_{11} с $60.8 \pm 4.1\%$ в 1979 г. до $30.1 \pm 2.1\%$ в 1992 г. (рис. 2,б). Увеличение частот “южных” вариантов XL_{00} наблюдалось: с $2.17 \pm 1.2\%$ в 1979 г. до $20.2 \pm 2.1\%$ в 1992 г. ($p < 0.05$) и в дальнейшем снижается к 2020 г. С 1979 по 2020 гг. постепенно увеличивается и доля гетерозигот XL_{01} (рис. 2,б; $p < 0.05$). Также в данной популяции комаров снижалась доля гетерозиготных особей XL_{12} с $31.1 \pm 3.4\%$ в 1974 г. до $1.1 \pm 0.7\%$ в 2020 г. (рис. 2,б; $p < 0.001$).

Хромосома 2 — 2R плечо. С 1974 по 1979 гг. доля комаров с разными частотами инверсионных вариантов хромосомы 2R варьировала. Доля особей с “южными” вариантами $2R_{00}$ увеличилась с $30.1 \pm 3.6\%$ в 1979 г. до 100% в 2003 г. (рис. 2,б; $p < 0.001$), которая осталась стабильной же до 2020 г. ($98.9 \pm 0.7\%$). В это же время произошло снижение доли “северных” вариантов $2R_{11}$ с $22.6 \pm 2.6\%$ и вариантов $2R_{01}$ с $47.2 \pm 3.1\%$ в 1979 г., далее они изменились до 0% в 2003 г. (рис. 2,б; $p < 0.001$). В 2020 г. в популяции комаров п. Коларово было выявлено всего лишь $1.1 \pm 0.7\%$ особей с вариантами $2R_{01}$.

Хромосома 3. С 1979 г. доля особей с вариантами $3R_{11}$ с $41.7 \pm 3.1\%$ постепенно снизилась до $8.0 \pm 2.0\%$ в 2020 г., доля особей с вариантами $3R_{00}$ увеличилась с $13.5 \pm 2.1\%$ в 1974 г. до $72.9 \pm 3.3\%$ в 2020 г. (рис. 2,б; $p < 0.001$). Сходная картина отмечена и по хромосомному плечу 3L. С 1979 г. доля особей с инверсиями $3L_1$ с $25.9 \pm 2.4\%$ постепенно снизилась до $1.9 \pm 0.5\%$ в 2020 г. (рис. 2,а; $p < 0.05$). Доля особей с вариантами хромосом $3L_{11}$ в 2020 г. снизилась до 0% (рис. 2,б), такая же тенденция отмечена с гетерозиготами $3L_{01}$. Также наблюда-

Таблица 1. Сезонная динамика частот инверсионных генотипов в популяции *An. messeae* п. Коларово в 2020 г.

Вариант хромосомы	Частоты хромосомных вариантов (%)			
	05/2020	06/2020	07/2020	08/2020
Самцы				
XL ₀	30.0 ± 14.5	33.3 ± 12.6	7.1 ± 6.8	20.0 ± 10.3
XL ₁	70.0 ± 14.5	66.6 ± 12.6	92.9 ± 6.8	80.0 ± 10.3
<i>n</i>	10	21	14	15
Самки				
XL ₀₀	10.3 ± 4.8 (0.18)	12.3 ± 4.7 (0.51)	6.5 ± 5.9 (0.06)	15.1 ± 6.2 (0.18)
XL ₀₁	56.4 ± 7.9 (0.48)	77.5 ± 5.9 (0.41)	38.7 ± 11.8 (0.38)	48.5 ± 8.7 (0.49)
XL ₁₁	33.3 ± 7.5 (0.33)	8.2 ± 3.9 (0.08)	54.8 ± 12.0 (0.55)	33.3 ± 8.2 (0.32)
XL ₁₂	0	0	0	3.0 ± 3.0
XL ₁₄	0	2.0 ± 2.0	0	0
<i>n</i>	39	49	31	33
Самцы и самки				
2R ₀₀	100.0	100.0	100.0	97.9 ± 2.0 (0.98)
2R ₀₁	0	0	0	2.1 ± 2.0 (2)
2R ₁₁	0	0	0	0 (0.0001)
3R ₀₀	75.5 ± 6.1 (0.75)	74.3 ± 5.2 (0.74)	75.6 ± 6.4 (0.76)	77.1 ± 6.0 (0.76)
3R ₀₁	18.4 ± 5.5 (0.23)	17.1 ± 4.5 (0.24)	22.2 ± 6.2 (0.22)	16.7 ± 5.4 (0.23)
3R ₁₁	6.1 ± 3.4 (0.02)	8.6 ± 3.3 (0.02)	2.2 ± 2.2 (0.02)	6.2 ± 3.5 (0.01)
3L ₀₀	98.0 ± 2.0 (0.98)	100	91.1 ± 4.2 (0.90)	91.7 ± 4.0 (0.92)
3L ₀₁	2.0 ± 2.0 (0.02)	0	8.9 ± 4.2 (0.095)	8.3 ± 4.0 (0.077)
3L ₁₁	0 (0.0001)	0	(0.0025)	0 (0.0016)
<i>n</i>	49	70	45	48

Примечание. В скобках приведено теоретическое значение, вычисленное по закону Харди–Вайнберга.

лось увеличение доли особей вариантов 3L₀₀ с 51.8 ± 3.9% в 1974 г. до 95.7 ± 1.5% в 2020 г. ($p < 0.05$).

Анализ динамики инверсионного полиморфизма малярийного комара *Anopheles messeae* Fall. в период с 1974 по 2020 гг. по частотам инверсионных вариантов хромосом в популяции п. Коларово (рис. 2) показал замещение “северных” вариан-

тов в период 90-х гг. прошлого столетия “южными” вариантами и стабилизацию этих перемен до 2020 г.

Была проведена корреляция частотного распределения хромосомных инверсий с 1972 по 2020 гг. с годовой температурой, с полугодовой средней температурой с апреля по сентябрь и с полугодовой средней температурой с октября по март (рис. 1).

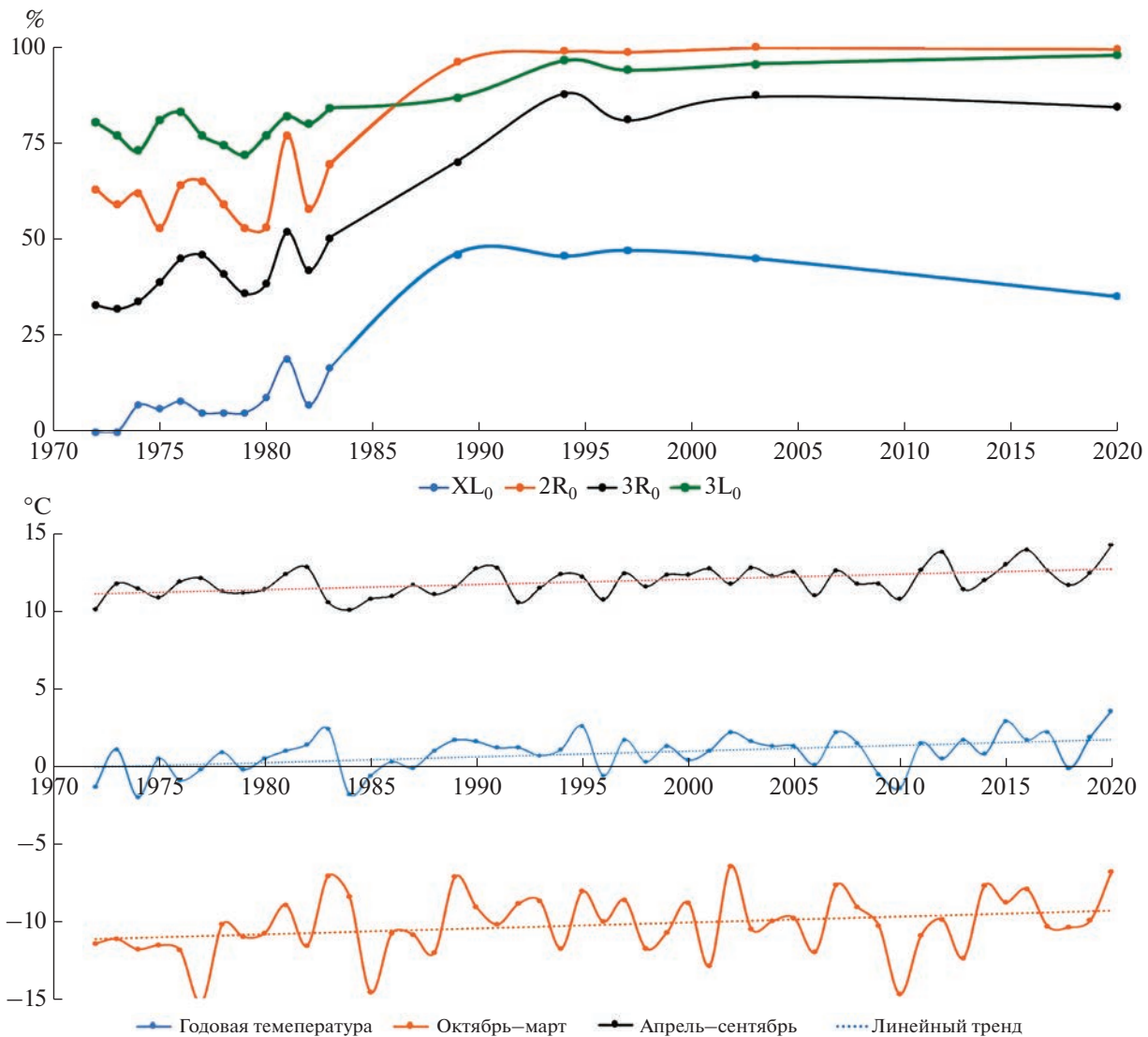


Рис. 1. Частотное распределение (десятилетний период) хромосомных инверсий и среднегодовых (по сезонам) температурных режимов в популяции *An. messeae* из п. Коларово (Томская обл.). На верхнем графике — частоты хромосомных последовательностей XL_0 , $2R_0$, $3R_0$, $3L_0$; на нижних — среднегодовые (по сезонам) температуры воздуха, апрель—сентябрь и октябрь—март.

Нами была выявлена корреляция частотного распределения хромосомных инверсий с 1972 по 2020 гг. с годовой температурой, включающей в себя полугодовую среднюю апрель—сентябрьскую и полугодовую среднюю октябрь—мартовскую температуру (рис. 1).

Все хромосомные последовательности XL_0 , $2R_0$, $3R_0$, $3L_0$ коррелируют с годовой и с полугодовой средней апрель—сентябрьской температурой (соответственно коэффициент корреляции $r_{XL} = 0.6$, $r_{2R} = 0.58$, $r_{3R} = 0.64$, $r_{3L} = 0.67$, $p < 0.05$) (апрель—сентябрь). Полугодовая средняя октябрь—мартовская температура коррелирует только с вариантами $3L_0$ ($p < 0.05$), с остальными корреляция не была выявлена (октябрь—март, рис. 1).

Частоты инверсионных вариантов хромосомы XL_0 с начала 1972 г. наблюдались на уровне 5–10% до 1980 г., и только в 1981 г. отмечено резкое возрастание частоты XL_0 до 21%, а затем увеличение до 46.1% в 1989 г. В 2020 г. отмечено снижение частоты XL_0 до 33%, и при этом идет увеличение гетерозигот XL_{01} (рис. 2, табл. 1).

С 1972 по 1980 гг. частоты инверсионных вариантов хромосомы XL_0 наблюдались на уровне 5–10%, и только в 1981 г. было выявлено резкое возрастание частоты XL_0 до 21%, а затем в 1989 г. наблюдалось увеличение до 46.1%. В 2020 г. выявилось снижение частоты XL_0 до 33%, параллельно с этим, произошло увеличение гетерозигот XL_{01} (рис. 2, табл. 1).

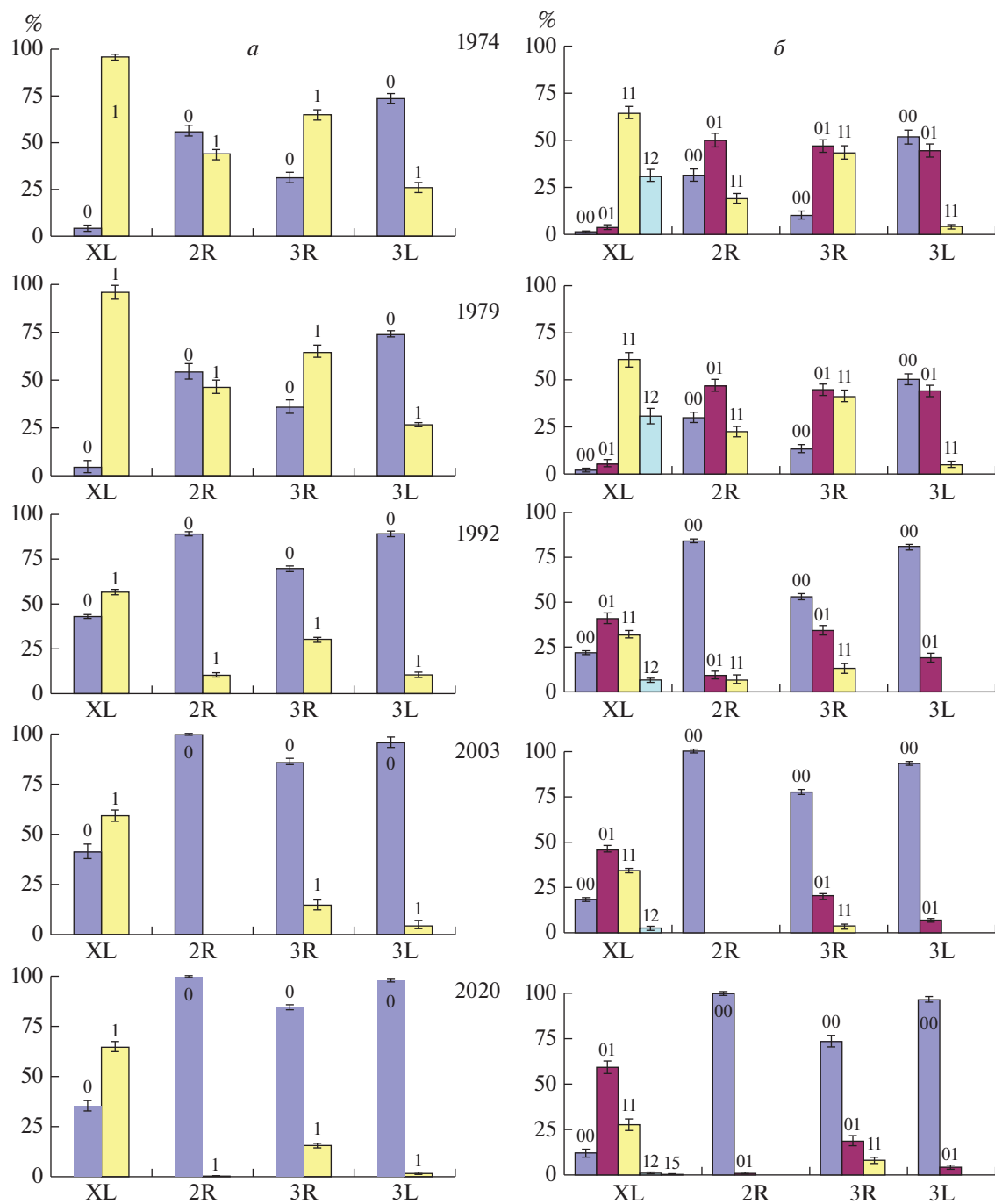


Рис. 2. Долговременная динамика инверсионного полиморфизма малярийного комара *Anopheles messeae* Fall. в популяции центральной части видового ареала (Западная Сибирь, Томская обл.). *a* – динамика популяций малярийных комаров по инверсионным вариантам по годам (0, 1 – варианты инверсий XL_0 , XL_1 , 0, 1 – инверсионные варианты аутосом – 2R, 3R, 3L); *б* – динамика частот инверсионных вариантов хромосом по годам (00, 01, 11, 12, 15 – инверсионные варианты половой хромосомы XL; 00, 01, 11 – инверсионные варианты аутосом – 2R, 3R, 3L). Вертикальными линиями указан доверительный интервал ($p < 0.05$).

Частоты инверсионных вариантов хромосомы $2R_0$ показали межгодовые колебания от 54 до 67%, а в 1981 г. ее концентрация достигла 78%, а в 2020 г. достигла уже 99.5%.

Также были обнаружены межгодовые частотные колебания от 54 до 67% инверсий хромосомы $2R_0$, в 1981 г. ее концентрация достигла 78%, а в 2020 г. достигла уже 99.5%. Аналогичная ситуация

выявилась и для хромосомы $3R_0$: обычные колебания — от 33 до 46%, в 1981 г. — скачок до 54%, и продолжила увеличиваться до 2020 г. — 84.4%. Последовательность хромосомы $3L_0$ встречается в довольно высоких концентрациях (от 73 до 84%) до 1983 г., а затем возросла до уровня 96% в 1994 г., которая не снижалась с этого уровня до 2020 г.

ОБСУЖДЕНИЕ

В популяции *An. messeae* выявлено пять широко распространенных по ареалу инверсий. Определенные сочетания инверсий в кариотипах *An. messeae* встречаются гораздо чаще и формируют адаптивные комплексы:

1. $XL_{11}2R_{11}3R_{11(01)}3L_{00(01,11)}$ (север);
2. $XL_{22(12)}2R_{11(01)}3R_{11(01)}3L_{00(01,11)}$ (северо-восток);
3. $XL_{11}2R_{01}3R_{00(01,11)}3L_{00(01,11)}$ (центр);
4. $XL_{00(01)}2R_{00}3R_{00(01)}3L_{00(01)}$ (юго-запад);
5. $XL_{11}2R_{00}3R_{00(01,11)}3L_{00(01,11)}$ (юго-восток).

В скобках после кариотипов указаны области ареала, где такие сочетания доминируют или встречаются с 100% частотой. Весь кариофонд условно делят на две группы: “северные” хромосомные сочетания (1), (2) и “южные” (4), (5) [25]. Рекомбинанты (3) встречаются относительно редко и образуются при скрещивании особей с “северными” и “южными” вариантами. Сочетания хромосом обусловлены ассортативным скрещиванием [25]. При этом хромосомный полиморфизм в популяциях *An. messeae* вероятно поддерживается не за счет сверхдоминирования, а в результате различной приспособленности комаров с разными хромосомными сочетаниями на разных этапах сезонного цикла [28–30]. Комары с альтернативными кариотипами отличаются по физиологии, пищевому поведению, скорости развития, плодовитости и другим характеристикам [7, 15, 29, 30]. При этом гомозиготы имеют селективное преимущество.

Сопоставление частотной динамики инверсий с среднесезонными температурными режимами за весь период наблюдения популяции показывает корреляцию изменений частот хромосомных инверсий с потеплением климата. Для комаров *An. messeae* температура является основным абиотическим фактором, лимитирующим процессы жизнедеятельности на всех стадиях развития. Характер кривых температур за 49 лет наблюдений позволяет заключить, что наиболее теплым был 2020 г. Минимальные температуры отмечены в период 1974, 1983 и 2010 гг. Повышение температуры (особенно в зимний период) привело к резкому снижению гетерозиготности изученной популяции п. Коларово Томской обл., что свидетельствует о направленной гомозиготизации в пользу хромосомных вариантов, доминирующих на юге и юго-западе ареала. Существенная частотная реоргани-

зация хромосомных инверсий имеет явный адаптивный характер и, как показали эксперименты [7], связана с тепловым режимом обитания. Экспериментальный анализ развития личинок при разных температурах воды показал, что выживаемость гомозигот XL_{00} и $3R_{00}$ выше при оптимальных температурах развития (23°C), чем при крайне низких и высоких. Частоты гетерозигот XL_{01} и $3R_{01}$, наоборот, в оптимальных условиях развития сильно падают.

Изменение частот инверсионных вариантов хромосомы $2R$ было впервые зарегистрировано в п. Коларово Томской обл. С 1975 г. частоты вариантов $2R_0$ начали существенно увеличиваться в выборках личинок. Важным следствием потепления является резкое снижение частоты хромосомы $2R_1$ в Сибирском регионе (п. Коларово) в период с 1992 г. по настоящее время (рис. 1, 2). Эта инверсия имеет клинальное распределение в широтном направлении [8]. На юге ареала встречаются только гомозиготы $2R_{00}$, на севере таежной зоны — только гомозиготы $2R_{11}$. В центре ареала происходит гибридизация комаров с альтернативными хромосомными последовательностями, но наблюдается дефицит гетерозигот $2R_{01}$. Инверсия $2R_{11}$ в составе генокомплекса (1) и (2) ранее доминировала на севере ареала и связана с высокой разовой плодовитостью самок, что важно в условиях короткого летнего репродуктивного периода [28]. Очевидно, что удлинение лета в северных областях (особенно в Сибири) способствует повышению частоты хромосомы $2R_0$, которая связана с низкой разовой плодовитостью.

Изменение частот инверсионных вариантов хромосом резко нарастало к концу 80-х—началу 90-х гг. и затем стабилизировалось. “Скачок потепления” зимой 1981–1982 гг. привел к коррелированному с ним “частотному скачку” группы “юго-западных” хромосом в томской популяции (рис. 1). Последние 20 лет частоты хромосом практически не изменялись.

Таким образом, исключительность 1981 г. по тепловому режиму и скачок частоты инверсий XL_0 , $2R_0$ и $3R_0$ являются коррелированными. Как было ранее отмечено, эти варианты хромосом доминируют в популяциях западной части ареала *An. messeae* в условиях относительно мягкого климата Европы. В азиатской части преобладают альтернативные инверсии $XL_1(XL_2)$, $2R_1$, $3R_1$ и $3L_1$, причем замена первых на вторые идет клинально в связи с климатическими градиентами Палеарктики. По-видимому, зимняя и летняя высокие температуры 1981 г. оказали существенное влияние как фактор естественного отбора на томскую популяцию *An. messeae* и благоприятствовали “юго-западному” генокомплексу.

Построенная линия тренда на основе среднегодовых температур на графике с 1971 по 2020 гг.

показывает увеличение температур (рис. 1). Рассчитанная средняя скорость роста среднегодовой температуры воздуха на территории Российской Федерации с 1976 по 2018 гг. составила 0.47°C/10 лет при скорости роста глобальной температуры за тот же период: 0.17–0.18°C/10 лет [31]. Очевидно, что направленная перестройка кариотипической структуры *An. messeae* в Западной Сибири обусловлена климатическими изменениями общими для всего региона. Такие же перестройки кариотипической структуры были показаны и в п. Тегульдет, расположенном в 215 км на северо-восток от г. Томск [32].

Анализ сезонных колебаний частот инверсий, проведенный с 1974 по 1976 гг., показал некоторое повышение частоты “юго-западных” вариантов (XL_0 , $2R_0$, $3R_0$, $3L_0$) в период летнего “расцвета” популяции от середины июля до середины августа и снижение частоты гетерозигот $3R_{01}$ [17]. Эта тенденция сохранилась в течение последних 30 лет.

Таким образом, в ходе настоящей работы проведена оценка уровня генетической изменчивости с 1974 г. по 2020 г. в популяции малярийного комара *An. messeae*, которая позволила вскрыть характер динамических процессов в связи с потеплением климата. Динамическая устойчивость адаптивного инверсионного полиморфизма — свидетельство отсутствия тенденций к видообразованию.

Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № FSWM-2020-0019), а также при поддержке Программы развития Томского государственного университета (Приоритет-2030).

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. Ревич Б.А. Изменение здоровья населения России в условиях меняющегося климата // Демография. 2008. С. 140–150.
2. Tolle M.A. Mosquito-borne Diseases // Curr. Problems in Pediatric and Adolescent Health Care. 2009. V. 39. I. 4. P. 97–140. <https://doi.org/10.1016/j.cppeds.2009.01.001>
3. Юрченко Ю.А., Белевич О.Э. Малярия и малярийные комары (*Anopheles*, *Culicidae*) Новосибирской области // Сиб. экол. журнал. 2010. Т. 17. № 5. С. 733–737.
4. Всемирная Организация Здравоохранения Европейское региональное бюро г. Копенгаген. Региональная стратегия: от борьбы к элиминации малярии в Европейском регионе ВОЗ (2006–2015 гг.). 2006. 44 с.
5. Новиков Ю.М. Эффекты глобального потепления: направленная динамика пропорции видов *Anopheles* и цитогенетической структуры таксона *Anopheles messeae* Fall. в Западной Сибири // Пробл. эволю. цитогенетики, селекции и интродукции. Матер. Научных чтений, посвященных 100-летию профессора В.П. Чехова. 2–5 декабря 1997 г. Томск: 1997. С. 73–86.
6. Ежов М. Европейская региональная программа “Обратим малярию вспять”. Результаты ее выполнения и взгляд в будущее. Переносчики малярии и мероприятия по борьбе с ними // Матер. Совещ. стран Европейского Региона ВОЗ, столкнувшихся с возвратом малярии. Алма-Ата: 2001. С. 19–22.
7. Стегний В.Н. Популяционная генетика и эволюция малярийных комаров. Томск: Изд-во Томского ун-та, 1991. 136 с.
8. Беклемишев В.Н. Экология малярийного комара. М.: Медгиз, 1944. 299 с.
9. Кабанова В.М., Карташова Н.Н., Стегний В.Н. Кариологическое исследование природных популяций малярийного комара в Среднем Приобье. I. Характеристика кариотипа *Anopheles maculipennis messeae* Fall. // Цитология. 1972. Т. 14. № 5. С. 630–636.
10. Стегний В.Н., Кабанова В.М., Новиков Ю.М., Плешкова Г.Н. Инверсионный полиморфизм малярийного комара *Anopheles messeae*. I. Распространение инверсий по ареалу вида // Генетика. 1976. Т. 12. № 4. С. 47–55.
11. Шипицина Н.К., Дылдина З.М. Влияние географических факторов на ход весенне-летнего развития // Сезонные явления в жизни малярийных комаров в Советском Союзе. М.: Издательство Минздрава СССР, 1957. С. 259–305.
12. Беклемишев В.Н., Желоховец А.Н. Ареалы некоторых видов *Anopheles* в СССР и причины, их обуславливающие // Бюлл. МОИП. 1945. Т. 50. Вып. 1–2. С. 56–73.
13. Cunha A. Chromosomal variation and adaptation in insects // Ann. Rev. Entomol. 1960. V. 5. P. 85–110. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.EN.05.010160.000505>
14. Баклушинская И.Ю. Хромосомные перестройки, реорганизация генома и видообразование // Зоол. журнал. 2016. Т. 95. № 4. С. 376–393. doi: 7868/S0044513416040036
15. Гордеев М.И., Москаев А.В. Хромосомный полиморфизм в популяциях малярийного комара *Anopheles messeae* (Diptera, *Culicidae*) в Поволжье // Генетика. 2016. Т. 52. № 6. С. 685–692.
16. Дубинин Н.Д., Тиняков Г.Г. Климат и распространение инверсий по ареалу вида *Drosophila funebris* // Докл. АН СССР. 1947. Т. 56. № 9. С. 965–968.
17. Плешкова Г.Н., Стегний В.Н., Новиков Ю.М., Кабанова В.М. Инверсионный полиморфизм малярийного комара *Anopheles messeae*. Сообщение III. Временная динамика концентраций инверсий в популяции центра ареала // Генетика. 1978. Т. 14. № 12. С. 2169–2176.
18. Перевозкин В.П. Научно-практическое руководство по малярии. Томск: Изд-во Томского ун-та, 2007. С. 105.

19. Ayala D., Guerrero R.F., Kirkpatrick M. Reproductive isolation and local adaptation quantified for a chromosome inversion in a malaria mosquito // *Evolution*. 2013. 67(4). P. 946–958.
<https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2012.01836.x>
20. Ayala D., Ullastres A., González J. Adaptation through chromosomal inversions in *Anopheles* // *Frontiers in Genetics*. 2014. V. 5. P. 129.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00129>
21. Ayala D., Acevedo P., Pombi M. et al. Chromosome inversions and ecological plasticity in the main African malaria mosquitoes // *Evolution*. 2017. V. 71(3). P. 686–701.
<https://doi.org/10.1111/evo.13176>
22. Чубарева Л.А. Хромосомный полиморфизм в природных популяциях кровососущих мошек и некоторых других двукрылых насекомых // *Цитология*. 1974. Т. 6. № 3. С. 267–280.
23. Русакова А.М., Артемов Г.Н., Стегний В.Н. Инверсионный полиморфизм природных популяций малярийного комара (*Anopheles messeae* Fall.) Восточной части ареала // *Вестник Томского гос. ун-та. Биология*. 2011. № 2 (14). С. 117–121.
24. Ayala D., Costantini C., Ose K. et al. Habitat suitability and ecological niche profile of major malaria vectors in Cameroon // *Malaria J.* 2009. V. 8. P. 307.
<https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-307>
25. Новиков Ю.М., Кабанова В.М. Адаптивная ассоциация инверсий в природных популяциях малярийного комара *Anopheles messeae* Fall. // *Генетика*. 1979. Т. 15. № 6. С. 1033–1045.
26. Стегний В.Н., Пищелко А.О., Сибатаев А.К., Абылкасымова Г. Пространственно-временные изменения частот хромосомных инверсий по ареалу малярийного комара *Anopheles messeae* Fall. (Culicidae) за 40-летний период мониторинга // *Генетика*. 2016. Т. 52. № 6. С. 664–671.
27. <http://www.pogodaiklimat.ru/history/29430.htm> (дата обращения: 04.02.2022).
28. Стегний В.Н., Кабанова В.М. Инверсионный полиморфизм малярийного комара *Anopheles messeae*. Сообщение IV. Локальный отбор и пространственная дифференциация инверсионных генокомплексов по плодовитости // *Генетика*. 1985. Т. 21. № 12. С. 1970–1973.
29. Бурлак В.А., Сибатаев А.К., Перевозкин В.П., Гордеев М.И. Взаимосвязь скорости поглощения пищи личинками двух видов малярийных комаров (Diptera; Culicidae) с их инверсионными генотипами // *Экология*. 1999. № 5. С. 379–381.
30. Перевозкин В.П., Гордеев М.И., Бондарчук С.С. Хромосомный полиморфизм и закономерности формирования субпопуляционной организации малярийных комаров *Anopheles* (Diptera, Culicidae) в местообитаниях Томской области // *Генетика*. 2009. Т. 45. № 4. С. 478–487.
31. Бардин М.Ю., Егоров В.И., Николаева А.М. и др. Доклад об особенностях климата на территории Российской Федерации за 2019 год. М.: Росгидромет, 2020. 97 с.
32. Стегний В.Н., Кабанова В.М., Новиков Ю.М. Карiotипическое исследование малярийного комара // *Цитология*. 1976. Т. 18. № 6. С. 760–766.

Long-Term and Seasonal Dynamics of Inversion Polymorphism of the Malaria Mosquito *Anopheles messeae* Fall. (Diptera: Culicidae) in the Population of the Central Part of the Species Range (Western Siberia, Tomsk Region)

A. K. Sibataev^a, I. E. Wasserlauf^a, K. E. Usov^a,
S. S. Alekseeva^a, G. M. Abylkassymova^b, and V. N. Stegny^{a, *}

^aTomsk State University, Tomsk, 634050 Russia

^bInstitute of Genetics and Physiology, Almaty, 050060 Kazakhstan

*e-mail: stegny@res.tsu.ru

The assessment of the level of genetic variability from 1974 to 2020 in the population of the malaria mosquito *Anopheles messeae* Fall. in the village of Kolarovo (Tomsk region) was carried out on the basis of cytogenetic analysis of polytene chromosomes. Analysis of the dynamics of inversion polymorphism of the malaria mosquito *Anopheles messeae* Fall. in the period from 1974 to 2020, according to the frequencies of inversion variants of chromosomes and gametes in the population village Kolarovo showed the replacement of “northern” variants in the period of the 90s of the last century with “southern” variants and the stabilization of these changes until 2020. The correlation of the frequency distribution of chromosomal inversions from 1972 to 2020 was revealed with an annual temperature including a semi-annual average April–September and semi-annual average October–March temperature. The results obtained made it possible to reveal the nature of dynamic processes associated with the modification of a specific ecological niche during a long period due to climate warming. The spatiotemporal stationarity (dynamic stability) of adaptive inversion polymorphism is evidence of high population-genetic (or rather species-specific) homeostasis and the absence of tendencies to speciation.

Keywords: *Anopheles messeae*, chromosomal polymorphism, inversions, malaria mosquitoes, population genetics.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ЧЕТЫРЕХРОГОВОГО
КЕРЧАКА *Myoxocephalus quadricornis* (Linnaeus, 1758)
И ЕГО ПОЛОЖЕНИЕ В ТРИБЕ *Myoxocephalini* Taranetz
(Cottidae: *Myoxocephalinae*)

© 2023 г. И. Н. Морева^{1, 2, *}, О. А. Радченко², А. В. Петровская²

¹Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского
Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, 690041 Россия

²Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Магадан, 685000 Россия

*e-mail: irruz@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.03.2022 г.

После доработки 27.04.2022 г.

Принята к публикации 11.05.2022 г.

Проведено молекулярно-генетическое и кариологическое исследование четырехрогого керчака *Myoxocephalus quadricornis* (Linnaeus, 1758). Впервые изучен кариотип и приведены результаты Ag-окрашивания хромосом экземпляров вида из Восточно-Сибирского моря. Кариотип *M. quadricornis* стабилен, содержит 32 (10 метацентриков, 2 субметацентрика, 20 субтелоцентриков) хромосомы, число хромосомных плеч — 44. Ядрышковые организаторы выявлены в теломерных районах коротких плеч двух гомологичных субтелоцентриков среднего размера. Обнаружена изменчивость по числу ядрышкообразующих хромосом и окрашиваемых блоков ядрышковых организаторов. Общие признаки в хромосомных наборах *M. quadricornis* и *Megalocottus platycephalus* указывают на их более значительную близость по сравнению с видами рода *Myoxocephalus*. Результаты кариологического анализа согласуются с молекулярно-генетическими данными о сестринских отношениях *M. quadricornis* и *Megalocottus platycephalus*. Выявлен комплекс кариологических и молекулярно-генетических признаков, позволяющих надежно отличать *M. quadricornis* от видов трибы *Myoxocephalini* и свидетельствующих о необходимости его выведения из рода *Myoxocephalus*.

Ключевые слова: триба *Myoxocephalini*, кариотип, маркерные хромосомы, ядрышковые организаторы (ЯО), митохондриальная ДНК, генетическая дифференциация.

DOI: 10.31857/S0016675823020066, **EDN:** KXUTDG

Арктический циркумполярный вид *Myoxocephalus quadricornis* — один из наиболее широко распространенных представителей подсемейства *Myoxocephalinae*. Кроме арктических морей он обитает в Северной Пацифике и Атлантике, южнее Берингова пролива до Анадырского лимана и залива Нортон, по атлантическому побережью Северной Америки до Лабрадора [1–3]. Рогатка встречается в хорошо прогреваемых водах с соленостью не выше 24‰, преимущественно 5–12‰, на глубинах от 0 до 50 м, а также в эстуариях и верховьях рек до 150 км от моря [4–6]. В отличие от видов подсемейства *Myoxocephalinae*, ведущих морской образ жизни, рогатка обитает в ряде крупных озер Евразии и Северной Америки, часть из которых не имеет сообщения с морем [7]. В озерах этот бычок образует реликтовые жилые формы. По мнению специалистов, реликтовые формы из озер Северной Америки и Европы произошли от

арктических морских *M. quadricornis*, вытесненных на юг, в пресноводные места обитания, в результате наступления ледников в раннем и среднем плейстоцене [5, 8–10]. Пресноводные рогатки, в отличие от морских, глубоководные, обитают при очень низкой температуре в хорошо насыщенной кислородом воде [4, 5]. В двух крупнейших озерах Канады этот бычок обнаружен на глубине около 366 м [11]. Несмотря на то что жилые формы считаются пресноводными, они способны обитать в солоноватых и сильно соленых водах [5].

Разнообразные условия обитания и географическая изоляция пресноводных жилых форм, морских и пресноводных популяций стали причиной возникновения значительной изменчивости морфологических признаков вида. Например, различия в числе позвонков; наличие/отсутствие заглазничных и затылочных бугров, бугорков ниже боковой линии; различия размеров и формы за-

глазничных и затылочных бугров [12–14]. В результате исследования мтДНК обнаружены генетические отличия североамериканской континентальной глубоководной рогатки от арктических морских и не имеющих выхода к морю популяций [9]. Вследствие разных точек зрения на значимость обнаруженных различий единое мнение о видовой и внутривидовой систематике рогаток отсутствует [1, 6].

До настоящего времени не решен вопрос о том, к какому роду относится рогатка. На основании изучения морфологических признаков, преимущественно сейсмосенсорной системы, этих бычков относят к роду *Trigloporus* Girard, 1851 [1]. В результате ДНК-штрихкодирования рогатка была включена в род *Myoxocephalus* Tilesius, 1811 [15]. Последующее изучение мтДНК видов рода *Myoxocephalus* показало, что *M. quadricornis* и остальные его виды принадлежат к разным филогенетическим группам [16]. Установлена близость четырехрового керчака с *Megalocottus platycephalus* (Pallas, 1814), предложено включить *M. quadricornis* в состав рода *Megalocottus* Gill, 1861 [17].

Для решения вопроса о положении четырехрового керчака в системе подсемейства *Myoxocephalinae* необходимы дальнейшие исследования, в том числе генетическими методами. До настоящего времени самостоятельные работы по кариологической и молекулярно-генетической дифференциации этого вида отсутствовали. Цель нашей работы — с помощью рутинного и Ag-окрашивания изучить хромосомный набор *Myoxocephalus quadricornis*, сравнить его с кариотипами видов родов *Myoxocephalus* и *Megalocottus*, сопоставить кариологические результаты с данными анализа изменчивости генов *COI*, цитохрома *b*, *16S* рРНК мтДНК, определить степень генетической дифференциации и родственные связи рогатки. В настоящем исследовании состав трибы *Myoxocephalini* (роды *Myoxocephalus* и *Megalocottus*) приведен по Неелову (1979), исключая род *Trigloporus*. В соответствии с каталогом рыб Мирового океана *Trigloporus quadricornis* является младшим синонимом *Myoxocephalus quadricornis* [18].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объем исследованного материала приведен в табл. 1. Рыбы выловлены сетями в июле 2021 г., в устье р. Пучеве (бассейн Чаунской губы Восточно-Сибирского моря). Видовая принадлежность экземпляров определена по морфологическим признакам [1]. Часть материала для молекулярно-генетического анализа (№ 2260, 2271, 2274, 2273) любезно предоставлена Валентиной Сиделевой (лаборатория ихтиологии Зоологического института РАН).

Кариологический анализ

Изучены кариотипы восьми самок, трех самцов *Myoxocephalus quadricornis*. Хромосомные препараты приготовлены из суспензии клеток переднего отдела почки рыб методом воздушного высушивания [19]. Для первичного анализа кариотипа хромосомы окрашивали 4%-ным раствором красителя Гимза (Giemsa). После просмотра под микроскопом и съемки лучших метафазных пластинок препараты отмывали в 70%-ном этиловом спирте. Затем для выявления активных ЯО на тех же препаратах проводили Ag-окрашивание [20].

Использовали общепринятую в цитогенетических исследованиях классификацию хромосом [21]. Равноплечие метацентрические (М) и неравноплечие субметацентрические (СМ) хромосомы относили к двуплечим, субтелоцентрические (СТ) с очень коротким вторым плечом и акроцентрические (А) с невидимым вторым плечом — к одноплечим хромосомам.

Для сравнительного анализа привлечены данные о кариотипах шести видов рода *Myoxocephalus* и *Megalocottus platycephalus* (северной *Megalocottus platycephalus platycephalus* (Pallas, 1814) и южной *M. p. taeniopterus* (Kner, 1868) дальневосточных широколобок) [22–25]. Хромосомные наборы *Megalocottus p. platycephalus* и *M. p. taeniopterus* сходны ($2n = 42$, $NF = 44 + 2$). В кариотипах изученных видов пара хромосом с изменчивой морфологией обозначена как субмета-субтелоцентрик (СМ-СТ) [16].

Молекулярно-генетический анализ

Проведен анализ изменчивости нуклеотидных последовательностей генов *COI*, цитохрома *b* и *16S* рРНК мтДНК *Myoxocephalus quadricornis* и видов трибы *Myoxocephalini*. Четыре вида семейства Cottidae из подсемейств *Myoxocephalinae* (*Microcottus sellaris* (Gilbert, 1895), *Porocottus minutus* (Pallas, 1814), *Argyrocottus zanderi* (Herzenstein, 1892)) и *Pseudoblenniiinae* (*Alcichthys elongatus* Steindachner, 1881) использованы как внешняя группа. Геномная ДНК выделена из мышечной ткани по стандартной методике, включающей лизис ткани 1% SDS в присутствии протеиназы К (0.2 мг/мл) и депротеинизацию фенолом [26]. Условия амплификации и секвенирования ДНК, последовательности олигонуклеотидных праймеров использованы из предшествующей работы: *COI* — F-33 и R-1421; цитохром *b* — L14795 и H15844; *16S* рРНК — L2510 и H3080 [27]. Секвенирование ДНК выполнено на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) в лаборатории генетики Института биологических проблем Севера ДВО РАН, Магадан, Россия.

Попарные генетические дистанции рассчитаны для объединенных последовательностей генов

Таблица 1. Список исследованных экземпляров *Myoxocephalus quadricornis*, видов трибы *Myoxocephalini* и внешней группы (* — образцы изучены кариологически)

Вид (№ образца)	Район сбора	Номер в GenBank		
		<i>COI</i>	<i>16S</i> рРНК	цит. <i>b</i>
<i>Myoxocephalus quadricornis</i> (2079)	Восточно-Сибирское море, Чаунская губа, устье р. Пучевеем	MN877736	MN871888	MN877761
<i>M. quadricornis</i> (2167)	»	MN877737	MN871889	MN877762
<i>M. quadricornis</i> (2308)*	»	OM758098	OM758108	OM801278
<i>M. quadricornis</i> (2309)*	»	OM758099	OM758109	OM801279
<i>M. quadricornis</i> (2310)*	»	OM758100	OM758110	OM801280
<i>M. quadricornis</i> (2311)*	»	OM758101	OM758111	OM801281
<i>M. quadricornis</i> *	»	—	—	—
<i>M. quadricornis</i> *	»	—	—	—
<i>M. quadricornis</i> *	»	—	—	—
<i>M. quadricornis</i> *	»	—	—	—
<i>M. quadricornis</i> *	»	—	—	—
<i>M. quadricornis</i> *	»	—	—	—
<i>M. quadricornis</i> *	»	—	—	—
<i>M. quadricornis</i> (2260)	Белое море, Кандалакшский з.	OM758102	OM758112	OM801282
<i>M. quadricornis</i> (2271)	»	OM758103	OM758113	OM801283
<i>M. quadricornis</i> (2274)	»	OM758104	OM758114	OM801284
<i>M. scorpius</i> (2273)	»	OM758105	OM758115	OM801285
<i>M. stelleri</i> (1754)*	Японское море, з. Восток	KY062754	KY062665	MH595735
<i>M. jaok</i> (1772)*	Охотское море, б. Шестакова	MN877722	MN871874	MN877747
<i>M. polyacanthocephalus</i> (1745)*	О-в Шикотан, б. Горобец	MN115338	MN097194	MN115374
<i>M. ochotensis</i> (1900)*	Охотское море, з. Одян	MH595733	MH588265	MH595734
<i>M. brandtii</i> (1988)*	Татарский пролив, з. Шебунина	MN877732	MN871884	MN877757
<i>Megalocottus platycephalus</i> (1790)	Охотское море, б. Шестакова	MH016197	MH012123	MH016217
<i>Microcottus sellaris</i> (2157)*	Японское море, о-в Русский	MN877738	MN871890	MN877763
<i>Porocottus minutus</i> (1934)*	Охотское море, о-в Недоразумения	MH172269	MH167465	MH172287
<i>Argyrocottus zanderi</i> (1734)	О-в Шикотан, б. Крабовая	MN877739	MN871891	MN877764
<i>Alcichthys elongatus</i> (2000)	Японское море, з. Восток	MH172282	MH167478	MH172300

COI, цитохрома *b*, *16S* рРНК мтДНК в программе MEGA X методом максимального правдоподобия (ML) с учетом гетерогенности скорости нуклеотидных замен (гамма-распределение G). Оптимальные модели нуклеотидных замен выбраны с использованием информационного критерия BIC (Bayesian Information Criterion) в программе MEGA X. Филогенетический анализ выполнен методом байесовского анализа в программе MrBayes v3.2.1 [28]. Для контроля динамики байесовского анализа использована программа Tracer v1.7 [29]. Установки для анализа МСМС были

следующие: четыре цепи, 1000000 генераций и отбор деревьев через каждые 100 генераций. Значения вероятности достигли плато в течение 12000–15000 генераций. Значения логарифмической вероятности увеличились с менее чем –6976.890 до примерно –3843.392 в первых 5000 генераций, затем примерно до –3787.602 после 500000 генераций. Из 10001 дерева первые 1001 с нестабильными параметрами моделей нуклеотидных замен были отброшены, а остальные использовались для получения консенсусных деревьев и апостериорных вероятностей их ветвления. Узлы ветвления с оцен-



Рис. 1. Метафазная пластинка и кариограмма *M. quadricornis* — $2n = 32$, NF = 44. Цифры (здесь и на рис. 2, 3) — порядковые номера пар хромосом в кариограмме. Хромосома изменчивой морфологии подчеркнута. Масштабная линейка: 10 мкм.

ками вероятности $\geq 95\%$ приняты как достоверные [30].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Кариологический анализ

Описание кариотипа *Myoxocephalus quadricornis* составлено по результатам анализа 300 рутинно окрашенных метафазных пластинок. Кариотип состоит из 32 хромосом ($2n$), число хромосомных плеч (NF) — 44 (рис. 1). Двуплечие хромосомы представлены парой крупных метацентриков (пара 1). Следующие три пары метацентриков (пары 2, 3, 4) — среднего размера. Метацентрики пятой пары среди двуплечий хромосом (пары 1–6) имеют самые мелкие размеры. Субметацентрики вида (пара 6) соответствуют по размерам его крупным метацентрикам (пара 1). Ряд одноплечий хромосом состоит из пары крупных субтелоцентриков (пара 7), короткие плечи которых, независимо от степени их спирализации, всегда хорошо выражены. Размеры этих субтелоцентриков сходны с размерами крупных метацентриков и субметацентриков (пары 1, 6) вида. У остальных девяти пар субтелоцентриков (пары 8–16), в разных метафазных пластинках, короткие плечи могут быть выражены в разной степени, но достаточной для того чтобы выделить их в отдельный, плавно уменьшающийся по размерам ряд. Пять пар метацентриков, пара крупных субметацентриков и пара крупных субтелоцентриков хорошо идентифицируются во всех исследованных метафазных пластинках и рассматриваются нами как маркерные в кариотипе *M. quadricornis*. Изменчивость по числу хромосом не обнаружена, различий по $2n$ и NF между кариотипами самцов и самок не выявлено.

Установлены общие признаки кариотипов *M. quadricornis* и изученных видов трибы *Myoxocephalini*. Четырехрогий керчак имеет одинаковое число хромосомных плеч (44) с *M. jaok* (Cuvier, 1829) и *M. scorpius* (Linnaeus, 1758) (рис. 1; рис. 2, а, б). У *M. quadricornis* так же, как у *Megalocottus p. taeniop-*

terus, при рутинном окрашивании наблюдается вариабельность размера короткого плеча одного из гомологов пары субтелоцентриков (рис. 1: пара 9; рис. 3, а: пара 5). В кариотипах видов можно выделить сходные по морфологии и размерам маркерные хромосомы.

Крупные метацентрики (рис. 1: пара 1) *M. quadricornis* соответствуют крупным метацентрикам *M. jaok* (рис. 2, а: пара 1); вторая и третья пары метацентриков четырехрогового керчака (рис. 1) — второй паре метацентриков у *M. jaok* (рис. 2, а); метацентрики 4-й пары (рис. 1) вида — метацентрикам *M. jaok* (рис. 2, а: пара 3), *M. scorpius* (рис. 2, б: пара 1), *M. stelleri* Tilesius, 1811 (рис. 2, в: пара 1) и *M. polyacanthocephalus* (Pallas, 1814) (рис. 2, г: пара 1). Мелкие метацентрики *M. quadricornis* (рис. 1: пара 5) сходны с таковыми у *M. jaok* (рис. 2, а: пара 8), *M. polyacanthocephalus* (рис. 2, г: пара 2), *M. ochotensis* Schmidt, 1929 (рис. 2, е: пара 1) и *Megalocottus platycephalus* (рис. 3, а: пара 1). Субметацентрики рогатки (рис. 1: пара 6) соответствуют по размеру субметацентрикам *M. jaok* (рис. 2, а: пары 9, 10), *M. scorpius* (рис. 2, б: пара 2) и *M. stelleri* (рис. 2, в: пара 2).

С помощью Ag-окрашивания проанализированы 210 метафазных пластинок вида. Активные ЯО локализованы в теломерных районах коротких плеч гомологичных субтелоцентриков средних размеров (рис. 4). В метафазных пластинках наблюдалась изменчивость в виде разного числа (одна или две) ядрышкообразующих хромосом (ЯО-хромосом) и по числу окрашиваемых блоков ЯО в хромосоме (рис. 4). В 45% метафазных пластинок окрашивались одинарные, в 40% — двойные и в 15% — тройные блоки ЯО. Число окрашиваемых ядрышек в интерфазных ядрах — одно или два.

Молекулярно-генетический анализ

Нуклеотидные последовательности участков генов *COI*, цитохрома *b* и *16S* рРНК размещены в GenBank/NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), их регистрационные номера указаны в табл. 1. Обнару-

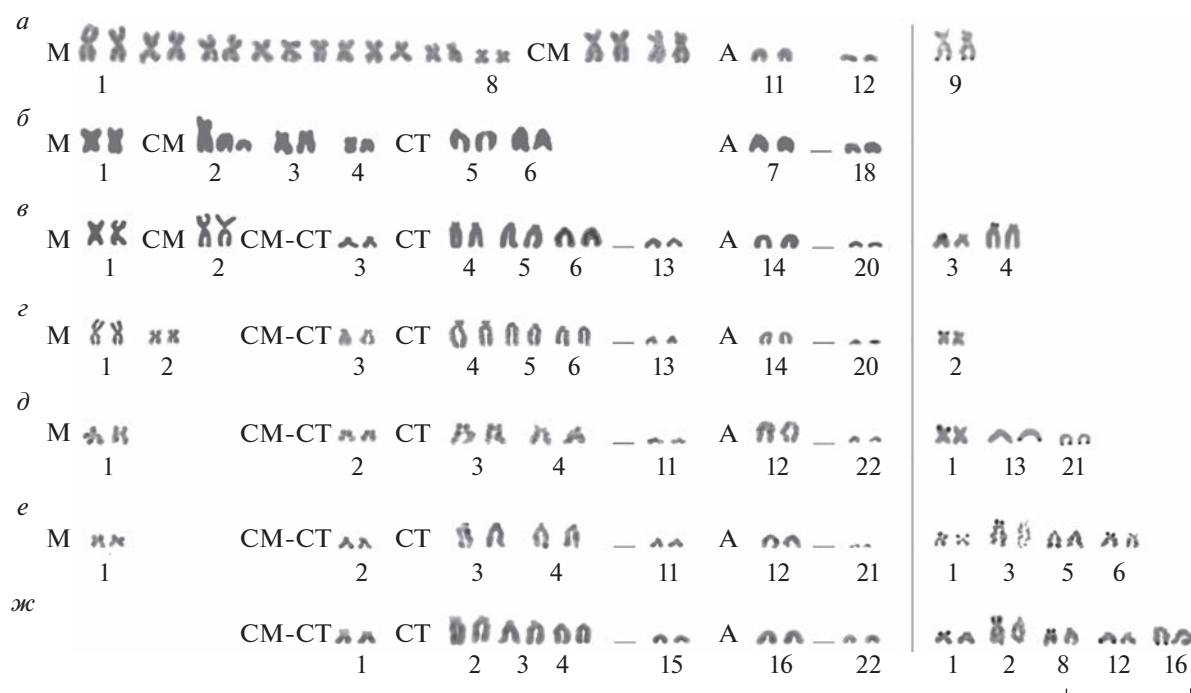


Рис. 2. Слева: кариограмма *Myoxocephalus jaok* – $2n = 24$, $NF = 44$ (a) и фрагменты кариограмм *M. scorpius* – $2n = 36$, $NF = 44$ (б, по: Васильев, 1985, с изменениями), *M. stelleri* – $2n = 40$, $NF = 44 + 2$ (в), *M. polyacanthocephalus* – $2n = 40$, $NF = 44 + 2$ (г), *M. brandtii* – $2n = 44$, $NF = 46 + 2$ (д), *M. ochotensis* – $2n = 42$, $NF = 44 + 2$ (е) и *M. stelleri* – $2n = 44$, $NF = 44 + 2$ (ж); справа: ЯО-хромосомы видов (по: Морева, Борисенко, 2017). Прочерк – СТ и А хромосомы среднего и мелкого размера пропущены. Масштабная линейка: 10 мм.

жены следующие показатели генетической изменчивости видов трибы *Myoxocephalini*. Для гена *COI* (1008 пар нуклеотидов, пн) идентифицировано 154 нуклеотидные замены и 149 полиморфных сайтов, 94 (9.3%) из которых филогенетически информативные. Из 336 кодируемых аминокислотных остатков варибельных нет. Для гена цитохрома *b* (747 пн) идентифицировано 142 нуклеотидные замены и 131 полиморфный сайт, 90 (12.1%) из которых филогенетически информативные. Из 249 кодируемых аминокислотных остатков пять варибельных. Для гена *16S* рРНК (600 пн) идентифицировано 15 нуклеотидных замен и 12 полиморфных сайтов, 11 (1.8%) из которых филогенетически информативные.

Показатели генетической изменчивости *M. quadricornis* следующие. Для гена *COI* идентифицировано 11 нуклеотидных замен и 11 полиморфных сайтов, шесть (0.6%) из которых филогенетически информативные. Для гена цитохрома *b* идентифицировано 16 нуклеотидных замен и 16 полиморфных сайтов, 10 (1.4%) из которых филогенетически информативные; из 249 кодируемых аминокислотных остатков четыре варибельных. Для гена *16S* рРНК идентифицировано три нуклеотидные замены и три полиморфных сайта, два (0.3%) из которых филогенетически информативные. У родатки обнаружено восемь гаплотипов.

Во всех исследованных генах обнаружены мутации, маркирующие вид *M. quadricornis* и отличающие его от видов рода *Myoxocephalus*: 40, 30 и 4 замены нуклеотидов для генов *COI*, цитохрома *b* и *16S* рРНК. В соответствии с данными табл. 2 значения ML-дистанций между мтДНК *M. quadricornis* и внешней группы варьируют от 7.06% (*M. quadricornis/Microcottus sellaris*) до 12.7% (*M. quadricornis/Alcichthys elongatus*). Между *M. quadricornis* и видами рода *Myoxocephalus* минимальное значение составило 6.93% (с *M. stelleri*, *M. polyacanthocephalus* и *M. ochotensis*), максимальное – 7.54% (с *M. brandtii*). Генетические дистанции между *M. quadricornis* и *Megalocottus platycephalus* варьируют от 2.75 до 2.88%. Среднее значение ML-дистанций в пределах *M. quadricornis* составило 0.45%.

По данным об объединенных последовательностях мтДНК реконструировано байесовское филогенетическое дерево (рис. 5). В основании находятся ДНК видов внешней группы, исключая *Microcottus sellaris*. Триба *Myoxocephalini* разделяется на кластер видов *Myoxocephalus* и кластер *M. quadricornis* вместе с *Megalocottus platycephalus*. К последнему кластеру присоединяется *Microcottus sellaris*. Оценки апостериорной вероятности ($PP \geq 0.95$) подтверждают достоверность ассоциаций типов ДНК.

ОБСУЖДЕНИЕ

В Восточно-Сибирском море рогатка — один из обычных видов морских прибрежных рыб [31, 32]. Так же как экземпляры вида от арктического побережья Аляски бычок из этой части ареала характеризуется сильным развитием на голове губчатых заглазничных и затылочных бугров, имеющих грибовидную форму. По мнению специалистов северная форма — подвид рогатки и должна иметь название *Trigloporus quadricornis polaris* (Sabine, 1821) [6]. Цитогенетические исследования особей вида из Восточно-Сибирского моря не проводились. В литературных источниках есть формула кариотипа *M. quadricornis* (*Trigloporus quadricornis*) из Белого моря [33]. Исходя из формулы кариотипа — $2n = 32$ (12M/CM + 20CT), NF = 44 [33: по 34] и полученных нами результатов, морские представители *M. quadricornis*, как и большинство изученных ранее видов рода *Myoxocephalus* и *Megalocottus platycephalus*, стабильны по числу хромосом. Исключением являются *M. scorpius* и *M. stelleri*, для которых описан полиморфизм по центрическому слиянию [22, 27].

Дифференциация бычков по основным признакам кариотипов

На основе проведенных исследований установлено, что *M. quadricornis* по $2n$ отличается от всех изученных видов *Myoxocephalus* (рис. 2) и *Megalocottus platycephalus* (рис. 3,а). Обнаруженное отличие может являться следствием разного числа робертсоновских транслокаций, произошедших в процессе эволюции хромосомных наборов бычков. Изучение рыб подсемейства *Myoxocephalinae* показало, что робертсоновские транслокации — это основной механизм эволюционного изменения кариотипов не только видов трибы *Myoxocephalini*, но и представителей триб *Microcottini* Neelov и *Enophryini* Taranetz [22, 35].

В кариотипах бычков рода *Myoxocephalus* (кроме *M. jaok*, *M. scorpius*) и *Megalocottus platycephalus* есть пара мелких субмета-субтелоцентриков (рис 2,в, г: пара 3,д, е: пара 2,ж: пара 1; рис. 3,а: пара 2). В разных клетках бычков в зависимости от длины коротких плеч они могут выглядеть как двуплечие или как одноплечие хромосомы, поэтому в NF указаны два дополнительных хромосомных плеча: $46 + 2$ и $44 + 2$ [16]. *M. jaok* резко отличается от всех видов рода *Myoxocephalus*. Его кариотип преимущественно представлен двуплечими хромосомами (рис. 2,а). При этом уровень дифференциации мтДНК *M. jaok* и остальных видов соответствует межвидовым различиям в этом роде [16]. У *M. scorpius* выделить субмета-субтелоцентрики не представляется возможным из-за сильной спирализации хромосом в представленной автором кариограмме [22]. У *M. quadricornis* эта пара хромосом



Рис. 3. Кариограмма — $2n = 42$, NF = 44 + 2 (а) и фрагменты кариограмм с ЯО-хромосомами с одинарными и двойными блоками ЯО у *M. platycephalus taeniopterus* (б); с одинарными, двойными и тройными блоками ЯО у *Megalocottus p. platycephalus* (в) (по: Морева, Борисенко, 2015, с изменениями). ЯО-хромосомы подчеркнуты. Масштабная линейка: 10 мм.

отсутствует. Большинство хромосом в метафазных пластинках вида хорошо идентифицируется. Исключением является один из гомологов пары субтелоцентриков (рис. 1: пара 9). В исследованных метафазных пластинках (55%) *M. quadricornis* эта хромосома имеет второе плечо большего размера, чем у субтелоцентриков.

В отличие от большинства видов рода *Myoxocephalus* и *Megalocottus platycephalus* (рис. 2,б: пары 5, 6,в, г: пары 4, 5, д, е: пары 3, 4, ж: пары 2, 3; рис. 3,а: пары 3, 4), *M. quadricornis* имеет только одну пару крупных субтелоцентриков (рис. 1: пара 7). Возможно, причиной отсутствия у него второй пары маркерных хромосом этой морфологии является вовлечение их в робертсоновскую транслокацию. Размеры маркерных субтелоцентриков рогатки крупнее размеров маркерных субтелоцентриков видов рода *Myoxocephalus* и *Megalocottus platycephalus*. В отличие от четырехрогвого керчака у *M. stelleri*, *M. polyacanthocephalus*, *M. brandtii* и *Megalocottus platycephalus* можно выделить еще одну пару крупных одноплечих хромосом (рис. 2,в, г: пара 6, д: пара 12,ж: пара 4; рис. 3,а: пара 18) маркерную для этих видов. У *M. quadricornis* остальные субтелоцен-

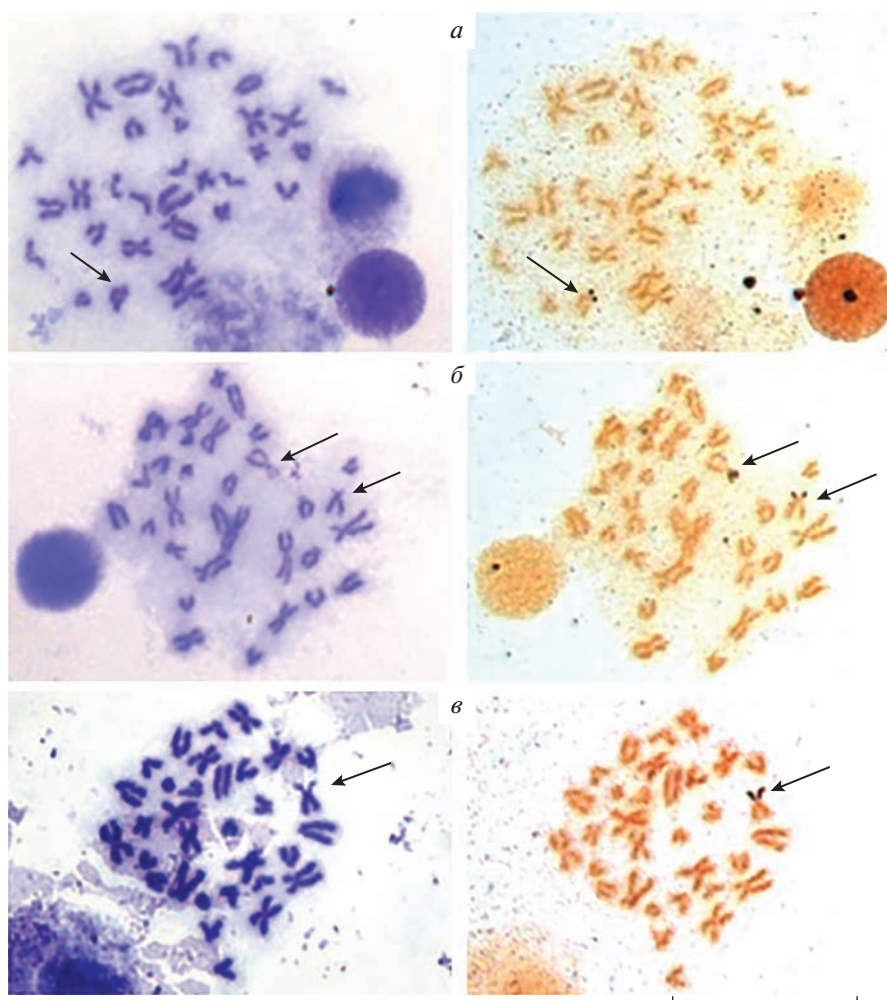


Рис. 4. Справа: метафазные пластинки *M. quadricornis* — рутинное окрашивание, слева: те же метафазные пластинки — Ag-окрашивание. ЯО-хромосомы с одинарными (а), двойными (б) и тройными (в) блоками ЯО указаны стрелками. Масштабная линейка: 10 мкм.

трические хромосомы — среднего и мелкого размера. В хромосомном наборе *M. quadricornis* отсутствуют акроцентрики, имеющиеся в кариотипах всех изученных видов *Myoxocephalus* и *Megalocottus*.

Дифференциация кариотипов бычков по числу и локализации активных ЯО

В кариотипах большинства исследованных видов рода *Myoxocephalus* активные ЯО расположены в двух и более парах хромосом (рис. 2, в, д, е, ж). В отличие от них у *M. quadricornis* ЯО имеются лишь в одной паре субтелоцентриков. ЯО в субтелоцентриках средних размеров, как один из вариантов локализации, встречается в кариотипах *M. ochotensis* и *M. stelleri* (при $2n = 44$). Однако ЯО-хромосомы *M. stelleri* (рис. 2, ж: пара 8) мельче, чем у *M. quadricornis*. Четырехрогий керчак и *M. ochotensis* различаются по локализации ЯО (рис. 2, е: пара 5; рис. 4). У *M. jaok* и у *M. polyacan-*

thocephalus так же, как и у *M. quadricornis*, ЯО расположены в одной паре хромосом, но у всех трех видов морфология ЯО-хромосом различна (рис. 2, а: пара 9, г: пара 2; рис. 4).

Несмотря на сходство хромосомных наборов *Megalocottus platycephalus platycephalus* и *M. p. taeniopterus*, они хорошо дифференцируются по числу и локализации активных ЯО (рис. 3). *M. quadricornis* отличается от *Megalocottus p. taeniopterus* по числу ЯО (рис. 3, б: пары 5, 18). Размеры ЯО-хромосом четырехрогого керчака (рис. 1: пара 9) и субтелоцентрических ЯО-хромосом *Megalocottus p. taeniopterus* (рис. 3, а: пара 5) сходны. У *Megalocottus p. platycephalus* так же, как и у *M. quadricornis*, ЯО локализованы в одной паре хромосом. Однако у северной дальневосточной широколобки ЯО окрашиваются в крупных субтелоцентриках (рис. 3, в: пара 3). У четырехрогого керчака, северной и южной дальневосточных широколобок наблюдается изменчивость морфологии ЯО-хромосом. У

M. quadricornis и *Megalocottus p. platycephalus* ЯО являются в виде одинарных, двойных и тройных хорошо различимых блоков; у *Megalocottus p. taeniopterus* — в виде одинарных и двойных блоков. В зависимости от числа блоков ЯО длина коротких плеч заметно изменяется, а хромосомы могут выглядеть (как при рутинном, так и при Ag-окрашивании) у *Megalocottus p. taeniopterus* как субтело-, субметацентрики (рис. 3,б), у *Megalocottus p. platycephalus* и *M. quadricornis* как субтело-, субмета- или даже метацентрики, (рис. 3,в; рис. 4). Идентификация данных пар хромосом у бычков возможна только после Ag-окрашивания.

Генетическая дифференциация *Myoxocephalus quadricornis*

Единое мнение о статусе вида *M. quadricornis* отсутствует. Его относят к роду *Triglopsis* [1, 36, 37], рассматривают в составе рода *Myoxocephalus* [2, 3], объединяют с *M. thompsonii* в комплекс видов или разделяют на подвиды *M. quadricornis quadricornis* и *M. q. thompsonii* [9, 38, 39].

Сравнительный кариологический анализ показал, что, несмотря на наличие общих признаков, *M. quadricornis* значительно отличается от видов рода *Myoxocephalus* по числу и морфологии хромосом, от большинства видов этого рода по числу хромосомных плеч. Самые значительные различия между ними заключаются в числе и локализации активных ЯО. Полученные данные полностью согласуются с результатами молекулярно-генетического исследования этих рыб. В предшествующей работе был проведен молекулярно-генетический анализ рода *Myoxocephalus*, в котором использовано два экземпляра четырехрогвого керчака из восточной части Арктики — Восточно-Сибирского моря [16]. В настоящей работе расширение выборки до девяти экземпляров и привлечение *M. quadricornis* из западной части Арктики (Белое море) подтвердило ранее полученные данные о значительных генетических отличиях *M. quadricornis* от остальных видов рода *Myoxocephalus*.

Значения ML-дистанций между видами рода *Myoxocephalus* варьируют в широких пределах — от 1.53 до 7.54% (табл. 2). Большой вклад в столь высокий уровень генетической дифференциации внутри рода вносят отличия мтДНК *M. quadricornis*, величина которых составляет в среднем 7.13%. Такая оценка соответствует различиям между видами близкородственных родов подсемейства *Myoxocephalinae*, но никак не различиям между видами одного рода. Например, ML-дистанции между *Microcottus sellaris* и *M. quadricornis*, которые принадлежат к близким родам, составляют 7.06–7.37%. Напротив, дистанции между *M. scorpius* и остальными видами рода *Myoxocephalus*, исключая *M. quadricornis*, составляют 3.36–3.97%, что в среднем в 2 раза ниже дистанций между видами разных родов.

На филогенетическом дереве (рис. 5) кластер мтДНК *M. quadricornis* располагается отдельно от кластера видов рода *Myoxocephalus*. Он образует общую группу с видами из других родов подсемейства *Myoxocephalinae*. При этом *M. quadricornis* наиболее близок с *Megalocottus platycephalus*. Генетические дистанции между ними соответствуют различиям между видами одного рода (среднее значение 2.8%). Достоверность положения *M. quadricornis*, обособленного от рода *Myoxocephalus* и ассоциированного с видами других родов, подтверждается высокими оценками вероятности. Большее сходство четырехрогвого керчака с *Megalocottus platycephalus*, чем с видами рода *Myoxocephalus*, обнаружено в результате сравнительного кариологического анализа. Их общие признаки: пара мелких метацентриков; одиночные ЯО-хромосомы сходной морфологии (с *Megalocottus p. platycephalus*); локализация у *M. quadricornis* и *Megalocottus p. taeniopterus* ЯО в субтелоцентриках сходных размеров; изменчивость числа блоков ЯО.

Сравнительный анализ полученных молекулярно-генетических данных и результатов аналогичных исследований показывает определенное сходство положения *M. quadricornis*. В работе Kontula, Väinölä (2003) комплекс *M. quadricornis* находится внутри клады рода *Myoxocephalus* [9]. По мнению авторов, признание валидности рода *Triglopsis* сделало бы остальных *Myoxocephalus* парафилетической группой. Исследование Knope (2013) показало, что *Triglopsis quadricornis* и *Megalocottus platycephalus* объединяются в общую кладу [37]. Вместе с *Myoxocephalus scorpioides* и *Microcottus sellaris* они образуют отдельную группу, родственную с видами *Myoxocephalus*. Mecklenburg с соавт. (2016) определяют *M. quadricornis* и *Megalocottus platycephalus* как сестринские виды, находящиеся в кладе рода *Myoxocephalus* [3]. Генетические дистанции между *M. quadricornis* и видами *Myoxocephalus* (5.1–9.2%) совпадают с различиями в пределах рода *Myoxocephalus* (2.1–10.5%), что, по мнению авторов, не подтверждает существования рода *Triglopsis*. Однако авторы не обсуждают загадочное положение одного рода в кладе другого и не проводят сравнительный анализ дистанций между близкими родами семейства Cottidae. Все приведенные выше молекулярно-генетические результаты определенно свидетельствуют о близком родстве *M. quadricornis* с *Megalocottus platycephalus*, но не с видами рода *Myoxocephalus*, и следовательно о необходимости пересмотра таксономического статуса четырехрогвого керчака.

Таким образом, сравнительный кариологический анализ *M. quadricornis* показал, что хромосомные наборы этого вида и керчаков трибы *Myoxocephalini* имеют общие признаки, доказывающие их родство. Наибольшее число общих признаков кариотипов обнаружено у *M. quadricornis* и *Megalocottus platycephalus*, что подтверждает их более зна-

Таблица 2. Значения ML-дистанций (в %) для объединенных последовательностей генов *COI*, цитохрома *b*, *16S* рРНК мтДНК *Myoxocephalus quadricornis*, видов трибы *Myoxocephalini* и внешней группы

Вид	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1. <i>Myoxocephalus quadricornis</i> (2079)																			
2. <i>M. quadricornis</i> (2167)	0.22																		
3. <i>M. quadricornis</i> (2308)	0.31	0.26																	
4. <i>M. quadricornis</i> (2309)	0.09	0.13	0.22																
5. <i>M. quadricornis</i> (2310)	0.22	0	0.26	0.13															
6. <i>M. quadricornis</i> (2311)	0.31	0.26	0.17	0.22	0.26														
7. <i>M. quadricornis</i> (2260)	0.70	0.65	0.74	0.61	0.65	0.74													
8. <i>M. quadricornis</i> (2271)	0.78	0.74	0.83	0.70	0.74	0.83	0.09												
9. <i>M. quadricornis</i> (2274)	0.70	0.65	0.74	0.61	0.65	0.74	0.26	0.35											
10. <i>M. scorpius</i> (2273)	7.15	7.11	7.28	7.15	7.11	7.28	7.11	7.11	7.19										
11. <i>M. stelleri</i> (1754)	6.97	6.93	7.02	6.97	6.93	7.02	7.02	7.11	7.02	3.36									
12. <i>M. jaak</i> (1772)	7.15	7.11	7.19	7.15	7.11	7.19	7.24	7.32	7.24	3.79	1.79								
13. <i>M. polyacanthocephalus</i> (1745)	6.97	6.93	7.02	6.97	6.93	7.02	6.93	7.02	7.02	3.71	1.53	2.05							
14. <i>M. ochotensis</i> (1900)	6.97	6.93	7.02	6.97	6.93	7.02	6.93	7.02	6.93	3.49	1.74	2.44	2.31						
15. <i>M. brandtii</i> (1988)	7.45	7.41	7.50	7.45	7.41	7.50	7.45	7.54	7.54	3.97	2.44	2.66	2.62	2.57					
16. <i>Megalocottus platycephalus</i> (1790)	2.75	2.79	2.88	2.75	2.79	2.88	2.79	2.88	2.79	7.24	7.19	7.32	7.02	7.19	7.50				
17. <i>Microcottus sellaris</i> (2157)	7.19	7.06	7.24	7.11	7.06	7.24	7.28	7.37	7.19	8.81	8.24	8.89	8.46	8.33	8.81	7.11			
18. <i>Porocottus minutus</i> (1934)	8.50	8.37	8.54	8.50	8.37	8.46	8.63	8.72	8.59	7.72	7.19	7.41	7.24	7.28	7.32	9.37	8.98		
19. <i>Argyrocottus zanderi</i> (1734)	8.98	8.85	9.02	8.89	8.85	8.94	8.81	8.89	8.85	8.59	8.41	8.41	8.41	8.24	8.24	9.68	8.89	9.24	
20. <i>Alcichthys elongatus</i> (2000)	12.77	12.64	12.77	12.69	12.64	12.77	12.60	12.69	12.47	13.12	13.08	13.21	12.95	13.21	12.90	13.51	12.60	12.82	13.12

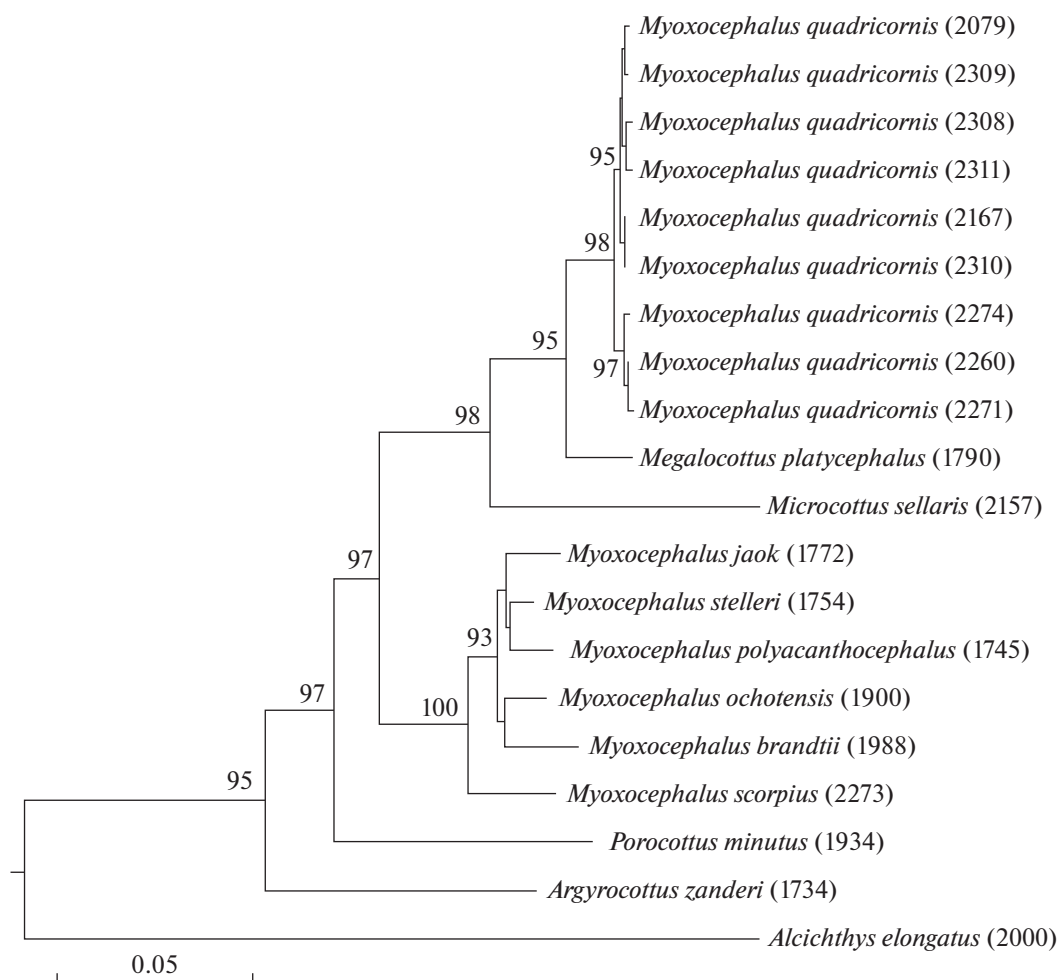


Рис. 5. Байесовское дерево видов трибы *Myoxocephalini* по данным об объединенных последовательностях генов *COI*, цитохрома *b* и *16S* рРНК митохондриального генома. Числа в основаниях кластеров — оценки апостериорной вероятности. Ваучерные номера показаны в скобках.

чительную близость по сравнению с видами рода *Myoxocephalus*. Выявлен комплекс кариологических и молекулярно-генетических маркерных признаков, позволяющих проводить идентификацию вида *M. quadricornis*. Обнаруженные существенные различия позволяют надежно дифференцировать *M. quadricornis* и виды трибы *Myoxocephalini*. Они доказывают принадлежность *M. quadricornis* и видов рода *Myoxocephalus* к разным филогенетическим линиям. Результаты кариологического и молекулярно-генетического исследования соответствуют данным сравнительного анализа сейсмочувствительной системы и морфологических признаков, на основании которых была обоснована родовая самостоятельность четырехрогвого керчака, целостность его выделения из рода *Myoxocephalus* и включения, согласно правилу приоритета, в отдельный род *Triglopsis* [1].

Работа выполнена при бюджетной поддержке в рамках НИР “Фауна, систематика и экология морских и пресноводных гидробионтов Северо-

Востока России” (Гос. Российская Федерация, № 0290-2019-0004), Институт биологических проблем Севера ДВО РАН, Россия.

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

Авторы заявляют о том, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Неелов А.В.* Сейсмочувствительная система и классификация керчаковых рыб (Cottidae: *Myoxocephalini*, *Arctiellinae*). Л.: Наука, 1979. 208 с.
2. *Парин Н.В., Евсеев С.А., Васильева Е.Д.* Рыбы морей России: аннотированный каталог. М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2014. 733 с.
3. *Mecklenburg C.W., Mecklenburg T.A., Sheiko B.A. et al.* Pacific Arctic Marine Fishes. CAFF Monitoring Series Report № 23. Akureyri, Iceland: Conserv. Arctic Flora and Fauna, 2016. 406 p.

4. McAllister D.E. Atlas of North American Freshwater Fishes, Queen's Printer. Onawa, Canada, 1978. 826 p.
5. Dickman M. An isolated population of fourhorn sculpins (*Myoxocephalus quadricornis*, family Cottidae) in a hypersaline high arctic Canadian lake // *Hydrobiologia*. 1995. V. 12. P. 27–35.
6. Неелов А.В. Рыбы Чаунской губы Восточно-Сибирского моря // *Арктика и Антарктика*. М.: Наука, 2008. С. 154–184.
7. Kottelat M., Freyhof J. Handbook of European Freshwater Fishes. Publ. Kottelat, Cornol and Freyhof, Berlin, 2007. 646 p.
8. Dadswell M.J. Post-glacial dispersal of four freshwater fishes on the basis of new distribution records from eastern Ontario and western Quebec // *J. Fish. Res. Board Can.* 1972. V. 29. P. 545–553.
9. Kontula T., Väinölä R. Relationships of Palearctic and Nearctic 'glacial relict' *Myoxocephalus* sculpins from mitochondrial DNA data // *Mol. Ecol.* 2003. V. 12. P. 3179–3184.
10. Sheldon T.A., Mandrak N.E., Lovejoy N.R. Biogeography of the deepwater sculpin (*Myoxocephalus thompsonii*), a Nearctic glacial relict // *Can. J. Zool.* 2008. № 86. P. 108–115.
11. Scott W.B., Crossman E.J. The freshwater fishes of Canada // *Bull. Fish. Res. Board Can.* 1973. № 184. P. 842–848.
12. McAllister D.E., Aniskowicz J. Vertebral number in North American sculpins of the *Myoxocephalus quadricornis* – complex // *J. Fish. Res. Board Can.* 1976. V. 33. P. 2792–2799.
13. Morrow J.E. The Freshwater Fishes of Alaska. Alaska Northwest Publishing Alaska: Company: Anchorage, 1980. 248 p.
14. Fallis B.W., Harbicht S.M., MacKenzie B.J. A Preliminary Study of the Limnology and Biology of Garrow Lake, Northwest Territories, an Arctic Meromictic Lake. Department of Fisheries and Oceans: Winnipeg, MB, 1987. 55 p.
15. Mecklenburg C.W., Möller P.R., Steinke D. Biodiversity of Arctic marine fishes: taxonomy and zoogeography // *Mar. Biodivers.* 2011. V. 41. P. 109–140.
16. Радченко О.А., Морева И.Н., Петровская А.В. Кариологическая и молекулярно-генетическая дивергенция керчаков рода *Myoxocephalus* Gill, 1859 (Cottidae) // *Генетика*. 2020. Т. 56. № 10. С. 1171–1183.
17. Balakirev E.S., Kravchenko A.Yu., Semchenko A.A. Genetic evidence for a mixed composition of the genus *Myoxocephalus* (Cottoidei: Cottidae) necessitates generic realignment // *Genes*. 2020. V. 11. P. 1071. <https://doi.org/10.3390/genes11091071>
18. Fricke R., Eschmeyer W.N., van der Laan R. (eds) Eschmeyer's catalog of fishes: Genera, species, references. 2022. (<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>). Electronic version accessed March 01, 2022.
19. Kligerman A.D., Bloom S.E. Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes // *J. Fish. Res. Board Can.* 1977. V. 34. P. 266–269.
20. Howell W.M., Black D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: A 1-step method // *Experientia*. 1980. V. 36. P. 1014–1015.
21. Levan A., Fredga K., Sandberg A.A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes // *Hereditas*. 1964. V. 52. P. 201–220.
22. Васильев В.П. Эволюционная кариология рыб. М.: Наука, 1985. 299 с.
23. Морева И.Н., Борисенко С.А. Кариотип северной дальневосточной широколобки *Megalocottus platycephalus* (Pallas, 1814) (Pisces: Cottidae) из залива Оды Охотского моря // *Биология моря*. 2014. Т. 40. № 2. С. 137–142.
24. Морева И.Н., Борисенко С.А. Кариотип южной дальневосточной широколобки *Megalocottus platycephalus taeniopterus* (Кнер, 1868) (Pisces: Cottidae) из залива восток Японского моря // *Биология моря*. 2015. Т. 41. № 6. С. 425–429.
25. Морева И.Н., Борисенко С.А. Кариотип многоиглового керчака *Myoxocephalus polyacanthocephalus* (Pallas, 1814) (Pisces: Cottidae) из российской части арела // *Биология моря*. 2017. Т. 43. № 1. С. 64–69.
26. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab., 1982. 480 p.
27. Moreva I.N., Radchenko O.A., Petrovskaya A.V. Differentiation of the frog sculpin *Myoxocephalus stelleri* Tilesius, 1811 (Actinopterygii, Cottidae) based on mtDNA and karyotype analyses // *Comp. Cytogenet.* 2021. V. 15. № 2. P. 179–197. <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v15.i2.63207>
28. Ronquist F., Teslenko M., Van Der Mark P. et al. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space // *Syst. Biol.* 2012. V. 61. P. 539–542.
29. Rambaut A., Drummond A.J., Xie D. et al. Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using tracer 1.7 // *Syst. Biol.* 2018. V. 67. P. 901–904.
30. Leache A.D., Reeder T.W. Molecular systematics of the eastern fence lizard (*Sceloporus undulatus*): A comparison of parsimony, likelihood, and Bayesian approaches // *Syst. Biol.* 2002. V. 51. P. 44–68.
31. Кириллов А.Ф., Анполихова О.Д., Жирков Ф.Н. и др. Аннотированный список рыбообразных и рыб бассейна Восточно-Сибирского моря // *Исслед. водн. биол. ресурсов водоемов Камчатки и сев.-зап. части Тихого океана*. 2016. Вып. 42. С. 78–87.
32. Черешнев И.А., Кириллов А.Ф. Рыбообразные и рыбы морских и пресных вод бассейнов морей Лаптевых и Восточно-Сибирского // *Вестн. СВНЦ ДВО РАН*. 2007. № 2. С. 95–100.
33. Лайус Д.Л. Хромосомные наборы 13 видов рыб Белого моря // *Проблемы изучения, рационального использования, охраны природных ресурсов Белого моря. Регулярная конф. Тез. докл. Петрозаводск*, 1992. С. 179–180.
34. Arai R. Fish Karyotypes. A Check List. Tokyo; Berlin; Heidelberg; N.Y.: Springer, 2011. 347 p. <https://doi.org/10.1007/978-4-431-53877-6>
35. Radchenko O.A., Moreva I.N., Petrovskaya A.V. The subfamily Myoxocephalinae of cottid fishes (Cottidae): Genetic divergence and phylogenetic relationships //

- J. Fish Biol. 2021. V. 99. P. 1857–1868.
<https://doi.org/10.1111/jfb.14886>
36. Бозуцкая Н.Г., Насека А.М. Каталог бесчелюстных и рыб пресных и солоноватых вод России с номенклатурными и таксономическими комментариями. М.: КМК, 2004. 389 с.
37. Knope M.L. Phylogenetics of the marine sculpins (Teleostei: Cottidae) of the North American Pacific Coast // Mol. Phylogenet. Evol. 2013. V. 66. P. 341–349.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.10.008>
38. Page L.M., Espinoza-Perez H., Findley L.T. et al. Common and Scientific Names of Fishes from the United States, Canada, and Mexico, 7th ed. American Fisheries Society. Special Publ. 34. Bethesda, 2013. 243 p.
39. Goto A., Yokoyama R., Sideleva V.G. Evolutionary diversification in freshwater sculpins (Cottoidea): A review of two major adaptive radiations // Environ. Biol. Fish. 2014. V. 98. P. 307–335.
<https://doi.org/10.1007/s10641-014-0262-7>

Genetic Differentiation of the Fourhorn Sculpin *Myoxocephalus quadricornis* (Linnaeus, 1758) and Its Position in the Tribe Myoxocephalini Taranetz (Cottidae: Myoxocephalinae)

I. N. Moreva^{a, b, *}, O. A. Radchenko^b, and A. V. Petrovskaya^b

^aZhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far East Branch,
Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690041 Russia

^bInstitute of Biological Problems of the North, Far East Branch,
Russian Academy of Sciences, Magadan, 685000 Russia

*e-mail: irruz@yandex.ru

A molecular genetic and karyological study of the fourhorn sculpin *Myoxocephalus quadricornis* (Linnaeus, 1758) was carried out. The karyotype was studied for the first time and the results of Ag-staining of the chromosomes of specimens of the species from the East Siberian Sea are presented. The karyotype of *M. quadricornis* is stable, contains 32 (10 metacentrics, 2 submetacentrics, 20 subtelocentrics) chromosomes, the number of chromosome arms is 44. Nucleolar organizers were found in the telomeric regions of the short arms of two homologous medium-sized subtelocentrics. Variability in the number of nucleolar-forming chromosomes and stained blocks of nucleolar organizers was found. Common features in the chromosome sets of *M. quadricornis* and *Megalocottus platycephalus* indicate their greater similarity compared to species of the genus *Myoxocephalus*. The results of the karyological analysis are consistent with the molecular genetic data about the sister relationships between *M. quadricornis* and *Megalocottus platycephalus*. A complex of karyological and molecular-genetic features has been identified that allow one to reliably distinguish *M. quadricornis* from species of the tribe Myoxocephalini and indicate the need for its removal from the genus *Myoxocephalus*.

Keywords: tribe Myoxocephalini, karyotype, marker chromosomes, nucleolar organizers (NOs), mitochondrial DNA, genetic differentiation.

ПОЛИГЕННЫЙ АНАЛИЗ ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ ГЕНОВ
ЦИТОКИНОВ И ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ
ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ© 2023 г. Г. Ф. Коротина¹ *, Ю. Г. Азнабаева², О. В. Кочетова¹, Т. Р. Насибуллин¹,
Л. З. Ахмадишина¹, Н. Н. Хуснутдинова¹, Н. Ш. Загидуллин², Т. В. Викторова²¹Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение Уфимского федерального
исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия²Бакинский государственный медицинский университет, Уфа, 450000 Россия

*e-mail: guly_kory@mail.ru

Поступила в редакцию 22.03.2022 г.

После доработки 16.05.2022 г.

Принята к публикации 31.05.2022 г.

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) является одним из наиболее распространенных хронических заболеваний органов дыхания с высоким уровнем заболеваемости и смертности. Патогенез ХОБЛ тесно связан с окислительным стрессом и системным воспалением. Цель настоящего исследования — выявление ассоциации полиморфных вариантов генов цитокинов и иммунного ответа с ХОБЛ. В работе были использованы образцы ДНК больных ($N = 601$) и здоровых ($N = 617$) индивидов. Полиморфные варианты генов *FASLG* (rs763110), *IL19* (rs2243193), *IL20* (rs2981573), *IL24* (rs291107), *PPBP* (rs352010), *IL4* (rs2243250, rs2070874), *C5* (rs17611), *FAS* (rs1800682), *IL4RA* (rs1805010), *TGFb1* (rs1800469) были проанализированы методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Показана ассоциация генов *IL19* (rs2243193) ($P = 0.00001$, OR = 0.73), *IL4* (rs2243250) ($P = 0.024$, OR = 1.27), *IL4* (rs2070874) ($P = 0.00001$, OR = 0.62) в лог-аддитивной модели, *PPBP* (rs352010) ($P = 0.00001$, OR = 2.34) в рецессивной модели с ХОБЛ. Для проведения полигенного анализа включали полиморфные локусы ранее изученных генов цитокинов (*IL12RB2*, *IL12B*, *IL12A*, *IL13*). С помощью алгоритма APSampler получены информативные паттерны, ассоциированные с ХОБЛ; большинство наиболее значимых протективных комбинаций включали аллель *A* гена *IL19* (rs2243193) и аллель *C* или генотип *TC* гена *PPBP* (rs352010), а также генотип *AA* гена *IL20* (rs2981573). Наибольший риск развития ХОБЛ определялся сочетанием аллелей трех функционально взаимосвязанных цитокинов: *G* гена *IL12A* (rs2243115), *A* гена *IL13* (rs20541) и *C* гена *IL4* (rs2070874) (OR = 2.72). По результатам множественного регрессионного и ROC-анализа получена прогностическая модель риска формирования ХОБЛ, включающая такие признаки как возраст и индекс курения, а также генетические маркеры: комбинация аллеля *A* *IL19* (rs2243193) и генотипа *AA* *IL20* (rs2981573), *IL19* (rs2243193), *IL12A* (rs2243115), *PPBP* (rs352010) и *IL4* (rs2070874) (AUC = 0.895, чувствительность — 85.5%, специфичность — 77.5%).

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, цитокины, воспаление, полигенный анализ, *IL19*, *PPBP*.

DOI: 10.31857/S0016675823020042, **EDN:** KXHQJD

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) представляет собой многофакторное заболевание легких, характеризующееся прогрессирующим ограничением воздушного потока и гипервоспалительным ответом легких на вдыхание вредных частиц [1]. ХОБЛ является одним из наиболее распространенных хронических заболеваний органов дыхания с высоким уровнем заболеваемости и смертности. Курение табака, загрязнение окружающей среды и генетическая предраспо-

ложенность являются основными факторами риска ХОБЛ [2]. Воздействие табачного дыма индуцирует патологические процессы в легких, что приводит к системному воспалительному ответу. Воспаление — ключевой фактор развития ХОБЛ. Активированные в результате окислительного стресса макрофаги и нейтрофилы секретируют провоспалительные цитокины, хемокины, которые циркулируют в кровотоке и стимулируют секрецию белков острой фазы [1]. Генетические механизмы развития ХОБЛ

активно изучаются по всему миру [3]. Имеются доказательства того, что гены, кодирующие цитокины и воспалительные медиаторы играют важную роль в развитии ХОБЛ [4]. Ранее, используя полигенный анализ, мы продемонстрировали наличие ассоциаций с ХОБЛ ряда полиморфных вариантов генов хемокинов [5]. ХОБЛ — это многофакторное полигенное заболевание, развивающееся в результате сложного взаимодействия множества генов, и, как следствие, вклад отдельных полиморфных маркеров может быть невелик или вовсе не проявляться.

Полученные нами результаты позволяют предположить, что мультилокусный подход является более эффективным в идентификации генетических предикторов развития многофакторных заболеваний. В данной работе нами продолжено изучение ген-генных взаимодействий при развитии ХОБЛ. Цель настоящего исследования — выявление ассоциации полиморфных вариантов генов цитокинов и иммунного ответа *IL19*, *IL20*, *IL24*, *PPBP*, *IL4*, *IL4RA*, *C5*, *FAS*, *FASLG*, *TGFb1* с ХОБЛ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования — кандидатное исследование по принципу случай—контроль. Использовали образцы ДНК неродственных индивидов, татар по этнической принадлежности, проживающих на территории Республики Башкортостан. Исследование одобрено комитетом по этике ИБГ УНЦ РАН (протокол № 17 от 07.12.2010). От всех участников исследования получали информированное добровольное согласие на использование биологического материала в планируемых исследованиях. Группа больных включала 601 индивид (из них 522 мужчин (86.85%) и 79 женщин (13.15%)), средний возраст составил 63.38 ± 11.81 лет. Среди больных ХОБЛ курильщиков и бывших курильщиков — 484 человека (80.53%), некурящих — 117 (19.47%). Индекс курения у курильщиков и бывших курильщиков составил 44.58 ± 25.92 пачек/лет. Группа контроля включала 617 индивидов (из них 548 мужчин (88.88%) и 69 женщин (11.12%)), средний возраст составил 58.44 ± 14.79 , курильщики и бывшие курильщики — 517 (83.79%), некурящие — 100 (16.21%); индекс курения у курильщиков составлял 38.54 ± 23.12 пачек/лет. У всех больных исследовали функцию внешнего дыхания методом спирометрии, оценивали жизненную емкость легких (ЖЕЛ), форсированную жизненную емкость легких (ФЖЕЛ), объем форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ1), соотношение объема форсированного выдоха в 1 с и жизненной емкости легких (ОФВ1/ЖЕЛ). В группе больных показатели (в % от нормы) составляли: ОФВ1 = $41.68 \pm$

± 19.32 , ФЖЕЛ = 44.22 ± 17.88 , ЖЕЛ = 49.02 ± 15.54 , ОФВ1/ФЖЕЛ = 58.66 ± 13.66 . Подробное описание критериев включения и исключения из групп исследования описано нами ранее [6].

Генотипирование

ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови с использованием фенольно-хлороформной экстракции. Для нашего исследования были выбраны следующие полиморфные локусы: *FASLG* (rs763110, с.-844C>T), *IL19* (rs2243193, с.*258A>G), *IL20* (rs2981573, с.379-152A>G), *IL24* (rs291107, с.108-172T>C), *PPBP* (rs352010, с.-1411T>C), *IL4* (rs2243250, с.-589C>T), *IL4* (rs2070874, с.-33C>T), *C5* (rs17611, с.2422G>A, p.Val802Ile), *FAS* (rs1800682, с.-671A>G), *IL4RA* (rs1805010, с.223A>G, p.Ile75Val), *TGFb1* (rs1800469, с.-1347T>C). Функциональная значимость полиморфных локусов исследовалась по базам RegulomeDB Version 1.1 (<https://regulomedb.org>), SNPinfo Web Server (<https://snpinfio.niehs.nih.gov>) и HaploReg v3 [7]. Полиморфные варианты генов анализировали при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени коммерческими наборами с флуоресцентной детекцией (<https://www.oligos.ru>, ООО “ДНК-Синтез”, Россия) на приборе BioRad CFX96™ (“Bio-Rad Laboratories”, Inc., USA). Подробно методы анализа описаны нами ранее [5, 6].

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку данных проводили, используя пакеты прикладных программ Statistica v. 6.0 (StatSoft Inc., USA) и PLINK v. 1.07 [8]. Подробное описание стандартных методов статистического анализа приведено нами ранее [6]. Анализ ассоциаций сочетаний аллелей/генотипов с ХОБЛ осуществляли с помощью программы APSampler 3.6.1 (<http://sourceforge.net/projects/apsampler/>). Основной алгоритм описан в статье [9]. Поправку на множественное тестирование проводили с помощью метода оценки доли ложноположительных результатов FDR (false discovery rate, В. Hochberg), используя программу (<http://www.sdm-project.com/utilinies/?show=FDR>) и получали новое значение $P_{\text{cor-FDR}}$. Частоты гаплотипов, стандартные коэффициенты сцепления для LD (D') были рассчитаны в программе Haploview 4.2. С целью изучения взаимного влияния клинических и генетических факторов и оценки предиктивной ценности полиморфных локусов на риск развития ХОБЛ проведена статистическая обработка полученных результатов методами множественного регрессионного и ROC-анализа (receiver operating characteristic analysis), с вычислением пло-

щади под кривой (AUC – area under the curve) для оценки эффективности прогностической модели с использованием программного обеспечения IBM SPSS Статистика 22.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В сформированных выборках пациентов с ХОБЛ и контрольной группе проведен анализ полиморфных локусов генов цитокинов и иммунного ответа. Гены и SNP для анализа были выбраны в соответствии со следующими критериями: имеющие функциональную значимость и/или ранее для них были показаны ассоциации с другими многофакторными заболеваниями человека, частотой редких аллелей (MAF) $\geq 5\%$ в популяциях европеоидов по данным базы the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>). Функциональный анализ показал, что локус *IL19* (rs2243193) локализован в 3'-нетранслируемом регионе гена и изменяет сайты связывания для нескольких мРНК (*hsa-miR-1259*, *hsa-miR-135b*, *hsa-miR-27a*, *hsa-miR-27b*, *hsa-miR-450b-5p*, *hsa-miR-641*). Локус *PPBP* (rs352010) расположен в 2КВ-области гена, имеющего сайты связывания с несколькими транскрипционными факторами (ARNT, HIF). Локусы rs2070874 и rs2243250 гена *IL4* расположены в 5'-нетранслируемом регионе ДНК и 2КВ-области гена соответственно, имеющих сайты связывания для нескольких транскрипционных факторов. Локус *FAS* (rs1800682) расположен в области промотора гена и изменяет сайт связывания с несколькими транскрипционными факторами (STAT, ZBRK1, PAX3, SP-1), а локус *FASLG* (rs763110), согласно portalу GTEx (<https://www.gtexportal.org>), приводит к изменению экспрессии гена *FASLG* в различных тканях, в том числе и в легочной. Локус *TGFb1* (rs1800469) находится в 2КВ-области гена и изменяет сайт связывания для транскрипционного фактора NR2F1, что указывает на однозначное влияние данного полиморфизма на экспрессию гена. Таким образом, большая часть выбранных для исследования полиморфных локусов генов цитокинов и иммунного ответа оказывали влияние на экспрессию гена или были сцеплены с функциональными локусами гена.

Прежде чем приступить к анализу ассоциации аллельных вариантов генов-кандидатов с развитием ХОБЛ мы рассчитали частоты аллелей и генотипов в группах больных ХОБЛ и контроля и соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга (табл. 1). Выявленные частоты генотипов всех исследованных полиморфных локусов в группе контроля находились в соответствии с равновесием Харди–Вайнберга:

FASLG (rs763110) ($P_{X-B} = 0.24$), *IL19* (rs2243193) ($P_{X-B} = 0.084$), *IL20* (rs2981573) ($P_{X-B} = 0.7$), *IL24* (rs291107) ($P_{X-B} = 0.31$), *PPBP* (rs352010) ($P_{X-B} = 0.19$), *IL4* (rs2243250) ($P_{X-B} = 0.54$), *IL4* (rs2070874) ($P_{X-B} = 0.81$), *C5* (rs17611) ($P_{X-B} = 0.23$), *FAS* (rs1800682) ($P_{X-B} = 0.43$), *IL4RA* (rs1805010) ($P_{X-B} = 0.15$), *TGFb1* (rs1800469) ($P_{X-B} = 0.46$).

Далее нами была проведена оценка статистической значимости различий между группами по распределению частот аллелей и генотипов и рассчитаны показатели отношения шансов, для редкого аллеля каждого локуса. На следующем этапе, используя метод логистической регрессии, мы провели анализ ассоциации отдельных полиморфных локусов или гаплотипов сцепленных локусов в различных моделях (аддитивной, доминантной, рецессивной) с учетом количественных и бинарных признаков (пол, возраст, индекса массы тела), вводимых в уравнение регрессии в качестве независимых переменных; экспоненту отдельного коэффициента регрессии (beta) интерпретировали как отношение шансов (OR) с расчетом 95% доверительного интервала (в табл. 2 представлены статистически значимые результаты регрессионного анализа отдельных локусов, а в табл. 3 — анализ ассоциации гаплотипов сцепленных локусов).

Учитывая, что при многофакторных заболеваниях вклад отдельных генов в развитие заболевания может быть небольшим или вовсе не проявляться, нами был проведен поиск информативных ген–генных сочетаний, которые приводят к развитию ХОБЛ при помощи программы APSampler (Allelic Pattern Sampler). Данная программа использует метод Монте-Карло с цепями Маркова (MCMC), основанный на байесовских подходах, что позволяет идентифицировать сочетания аллелей и генотипов множественных локусов, ассоциированных с исследуемым признаком [9].

Когда речь заходит о диагностической и прогностической ценности полученных результатов молекулярно-генетического анализа, одним из наиболее предпочтительных аналитических инструментов анализа является поиск комплексных клиничко-генетических моделей риска развития патологии, поэтому на заключительном этапе нами была проведена статистическая обработка полученных результатов методами множественного регрессионного анализа с пошаговым включением наиболее значимых предикторов, с последующим ROC-анализом для оценки эффективности прогностической модели.

Таблица 1. Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных локусов исследованных генов в группах ХОБЛ и контроле

Ген, SNP	Редкий аллель	Генотип, аллели	ХОБЛ <i>n</i> (%) (<i>N</i> = 601)	Контроль <i>n</i> (%) (<i>N</i> = 617)	<i>P</i>	OR (95% CI)
<i>FASLG</i> rs763110 C>T	<i>T</i>	CC/CT/TT	279/227/95 (46.42/37.77/15.81)	264/268/85 (42.79/43.44/13.78)	0.1250	0.97 (0.82–1.15)
		C/T	785/417 (65.31/34.69)	796/438 (64.51/35.49)	0.7117	0.96 (0.82–1.14)
<i>IL19</i> rs2243193 A>G	<i>A</i>	GG/GA/AA	288/188/125 (47.92/31.28/20.80)	195/283/139 (31.60/45.87/22.53)	0.00001	0.73 (0.62–0.86)
		G/A	764/438 (63.56/36.44)	673/561 (54.54/45.46)	2.866×10^{-5}	0.68 (0.58–0.81)
<i>IL20</i> rs2981573 A>G	<i>G</i>	AA/AG/GG	295/245/61 (49.08/40.77/10.15)	281/267/69 (45.54/43.27/11.18)	0.457	0.90 (0.75–1.08)
		A/G	835/367 (69.47/30.53)	829/405 (67.18/32.82)	0.2437	0.89 (0.76–1.07)
<i>IL24</i> rs291107 T>C	<i>C</i>	TT/TC/CC	198/272/131 (32.95/45.26/21.80)	176/294/147 (28.53/47.65/23.82)	0.239	0.88 (0.75–1.04)
		T/C	668/534 (55.57/44.43)	646/588 (52.35/47.65)	0.1258	0.87 (0.74–1.03)
<i>PPBP</i> rs352010 T>C	<i>T</i>	CC/CT/TT	418/106/77 (69.55/17.64/12.81)	378/202/37 (61.26/32.74/6.00)	0.00001	0.97 (0.81–1.16)
		C/T	942/260 (78.37/21.63)	958/276 (77.63/22.37)	0.7808	0.96 (0.79–1.16)
<i>IL4</i> rs2243250 C>T	<i>T</i>	CC/CT/TT	319/234/48 (53.08/38.94/7.99)	362/225/30 (58.67/36.47/4.86)	0.033	1.27 (1.03–1.56)
		C/T	872/330 (72.55/27.45)	949/285 (76.90/23.10)	0.024	1.26 (1.05–1.51)

Таблица 1. Окончание

Ген, SNP	Редкий аллель	Генотип, аллели	ХОБЛ <i>n</i> (%) (<i>N</i> = 601)	Контроль <i>n</i> (%) (<i>N</i> = 617)	<i>P</i>	OR (95% CI)
<i>IL4</i> rs2070874 C>T	<i>T</i>	CC/CT/TT	412/186/3 (68.55/30.95/0.50)	367/219/31 (59.48/35.49/5.02)	0.00001	0.62 (0.50–0.78)
		C/T	1010/192 (84.03/15.97)	953/281 (77.23/22.77)	5.407 × 10 ^{−5}	0.64 (0.53–0.79)
<i>C5</i> rs17611 G>A	<i>A</i>	GG/GA/AA	200/276/125 (33.28/45.92/20.80)	205/288/124 (33.23/46.68/20.10)	0.946	1.01 (0.86–1.20)
		G/A	676/526 (56.24/43.76)	698/536 (56.56/43.44)	0.8729	1.01 (0.86–1.19)
<i>FAS</i> rs1800682 A>G	<i>G</i>	AA/AG/GG	210/269/122 (34.94/44.76/20.30)	193/294/130 (31.28/47.65/21.07)	0.392	0.92 (0.77–1.09)
		A/G	689/513 (57.32/42.68)	680/554 (55.11/44.89)	0.300	0.91 (0.78–1.07)
<i>IL4RA</i> rs1805010 A>G	<i>G</i>	AA/AG/GG	213/251/137 (35.44/41.76/22.80)	202/286/129 (32.74/46.35/20.91)	0.272	0.99 (0.84–1.16)
		A/G	677/525 (56.32/43.68)	690/544 (55.92/44.08)	0.8943	0.98 (0.84–1.15)
<i>TGFβ1</i> rs1800469 T>C	<i>T</i>	CC/CT/TT	290/240/71 (48.25/39.93/11.81)	261/273/83 (42.30/44.25/13.45)	0.112	0.85 (0.71–1.02)
		C/T	820/382 (68.22/31.78)	795/439 (64.42/35.58)	0.053	0.84 (0.71–0.99)

Примечание. *P* – значимость различий между группами по частотам аллелей и генотипов (тест χ^2 на тождественность выборок); OR – показатель отношения шансов для редкого аллеля (базовый аллельный тест).

Таблица 2. Статистически значимые результаты анализа ассоциации исследованных SNP с развитием ХОБЛ (лог-регрессионный анализ)

Ген, SNP	Редкий аллель	<i>N</i>	Генотип, модель	OR _{adj} (CI 95%)	<i>P</i> _{adj}	<i>P</i> _{cor-FDR}
<i>IL19</i> rs2243193 A>G	<i>A</i>	1218	<i>GG</i> <i>GA+AA</i> доминантная	1.00 0.50 (0.39–0.64)	0.00001	1.8×10^{-5}
			лог-аддитивная	0.73 (0.62–0.86)	0.00001	1.8×10^{-5}
<i>IL4</i> rs2243250 C>T	<i>T</i>	1218	<i>CC+CT</i> <i>TT</i> рецессивная	1.00 1.74 (1.02–2.95)	0.039	0.043
			лог-аддитивная	1.27 (1.03–1.56)	0.024	0.0308
<i>IL4</i> rs2070874 C>T	<i>T</i>	1218	<i>CC+CT</i> <i>TT</i> рецессивная	1.00 0.07 (0.02–0.31)	0.00001	1.8×10^{-5}
			лог-аддитивная	0.62 (0.50–0.78)	0.00001	1.8×10^{-5}
<i>PPBP</i> rs352010 T>C	<i>T</i>	1218	<i>CC</i> <i>CT+TT</i> доминантная	1.00 0.70 (0.54–0.89)	0.0044	0.0066
			<i>CC+CT</i> <i>TT</i> рецессивная	1.00 2.34 (1.52–3.60)	0.00001	1.8×10^{-5}
			лог-аддитивная	0.97 (0.81–1.16)	0.76	0.76

Примечание. *N* – количество индивидов, включенных в регрессионный анализ; *P*_{adj} – значимость для теста отношения правдоподобия лог-регрессионной модели с учетом возраста, статуса и индекса курения, индекса массы тела, пола. OR_{adj} – отношение шансов с учетом всех факторов, CI 95% – 95% доверительный интервал для OR; *P*_{cor-FDR} – значимость теста после коррекции FDR; лог-аддитивная модель на дозу редкого аллеля – увеличение дозы редкого аллеля в ряду: гомозигота по частому аллелю (0)–гетерозигота (1)–гомозигота по редкому аллелю (2).

Таблица 3. Ассоциация гаплотипов полиморфных локусов генов *IL19*, *IL20* и *IL4* с развитием ХОБЛ

Гаплотип	Частота ХОБЛ/контроль	OR (95%CI)	<i>P</i> _{adj}
<i>IL19</i> (rs2243193) A>G– <i>IL20</i> (rs2981573) A>G (<i>N</i> = 1218)			
G-A	0.617/0.509	1.55 (1.29–1.86)	2.073×10^{-6}
A-G	0.274/0.292	0.90 (0.75–1.09)	0.3883
A-A	0.082/0.162	0.43 (0.32–0.58)	1.078×10^{-7}
G-G	0.027/0.037	0.58 (0.35–0.98)	0.043
<i>P</i> -значение по распределению частот гаплотипов между группами			0.00001
<i>IL4</i> (rs2243250) C>T– <i>IL4</i> (rs2070874) C>T (<i>N</i> = 1218)			
C-C	0.627/0.653	0.896 (0.74–1.14)	0.3711
T-C	0.180/0.119	1.40 (1.05–1.86)	0.0037
T-T	0.139/0.123	0.82 (0.61–1.11)	0.4022
C-T	0.054/0.106	0.50 (0.35–0.72)	0.0016
<i>P</i> -значение по распределению частот гаплотипов между группами			0.00001

Примечание: *N* – количество индивидов, включенных в регрессионный анализ; *P*_{adj} – значимость для теста отношения правдоподобия лог-регрессионной модели с учетом возраста, статуса и индекса курения, индекса массы тела, пола. OR_{adj} – отношение шансов с учетом всех факторов, CI 95% – 95% доверительный интервал для OR; *D'* – коэффициент неравновесия по сцеплению между двумя локусами (коэффициент Левонтина); *r*² – коэффициент корреляции; *IL19* (rs2243193) и *IL20* (rs2981573) *D'* = 0.828, *r*² = 0.458; rs2243250C>T и rs2070874C>T гена *IL4* (*D'* = 0.46, *r*² = 0.15).

Анализ ассоциации отдельных полиморфных вариантов цитокинов и иммунного ответа с развитием ХОБЛ

Статистически значимые различия по распределению частот полиморфных вариантов между группами больных ХОБЛ и здоровыми индивидами были выявлены по полиморфным локусам генов *IL19* (rs2243193), *IL4* (rs2243250), *IL4* (rs2070874) и *PPBP* (rs352010) (табл. 1). Ассоциация локуса *IL19* (rs2243193) с ХОБЛ была установлена в доминантной ($P_{\text{adj}} = 0.00001$, OR = 0.50) и лог-аддитивной модели ($P_{\text{adj}} = 0.00001$, OR = 0.73) (табл. 2). Учитывая, что гены *IL19* (rs2243193), *IL20* (rs2981573) и *IL24* (rs291107) расположены на одной хромосоме 1q32.1 и находятся в одной группе сцепления, нами был проведен анализ гаплотипов данных локусов. Показано значимое неравновесие по сцеплению между полиморфными локусами *IL19* (rs2243193) и *IL20* (rs2981573) ($D' = 0.828$, $r^2 = 0.458$) (табл. 3). Установлены статистически значимые различия в характере распределения частот гаплотипов между группами больных ХОБЛ и контроля ($P = 0.00001$). Частота гаплотипа G-A по локусам *IL19* (rs2243193) и *IL20* (rs2981573) была значимо выше в группе ХОБЛ ($P_{\text{adj}} = 2.073 \times 10^{-6}$, OR = 1.55). Была выявлена ассоциация локуса *IL4* (rs2243250) с ХОБЛ в рецессивной ($P_{\text{adj}} = 0.037$, OR = 1.74) и лог-аддитивной моделях ($P_{\text{adj}} = 0.024$, OR = 1.27) (табл. 1, 2). Ассоциация локуса *IL4* (rs2070874) с ХОБЛ установлена в рецессивной ($P_{\text{adj}} = 0.00001$, OR = 0.07) и лог-аддитивной модели ($P_{\text{adj}} = 0.00001$, OR = 0.62). Выявлено неравновесие по сцеплению между локусами rs2243250 и rs2070874 гена *IL4* ($D' = 0.46$, $r^2 = 0.15$) и статистически значимые различия в характере распределения частот гаплотипов гена *IL4* между группами больных ХОБЛ и контроля ($P = 0.00001$) (табл. 3). Частота гаплотипа T-C по локусам rs2243250 и rs2070874 была значимо выше в группе больных ХОБЛ ($P_{\text{adj}} = 0.0037$, OR = 1.40). Установлена ассоциация локуса *PPBP* (rs352010) с ХОБЛ в доминантной ($P_{\text{adj}} = 0.0044$, OR = 0.70) и рецессивной модели ($P_{\text{adj}} = 0.00001$, OR = 2.34) (табл. 2).

Анализ ген–генных сочетаний полиморфных локусов генов цитокинов и иммунного ответа с развитием ХОБЛ

При помощи программы APSampler нами проведен поиск информативных ген–генных сочетаний ассоциированных с развитием ХОБЛ. В анализ помимо одиннадцати исследованных полиморфных локусов были включены еще пять изученных нами ранее локусов генов цитокинов: *IL12RB2* (rs3762317), *IL12B* (rs3212227), *IL12A*

(rs568408), *IL12A* (rs2243115), *IL13* (rs20541) [10]. Выявлены 2587 паттернов, ассоциированных с ХОБЛ; в табл. 4 отражены результаты наиболее значимых комбинаций с P_{FDR} менее 0.05 и OR более 1.5 (для комбинаций риска) или OR менее 0.4 для протективных комбинаций. Большинство выявленных комбинаций включали аллели или генотипы генов *PPBP* (rs352010) (девять ген–генных сочетаний), *IL19* (rs2243193) (шесть ген–генных сочетаний) и *IL12A* (rs568408) (шесть ген–генных сочетаний). Наиболее значимые комбинации, которые ассоциировались с пониженным риском развития ХОБЛ, включали аллель A локуса *IL19* (rs2243193) и аллель C или генотип TC локуса *PPBP* (rs352010), а также генотип AA локуса *IL20* (rs2981573). Генотип CC локуса *PPBP* (rs352010) являлся обязательной частью трех паттернов, связанных с риском развития ХОБЛ. Но наибольший риск развития ХОБЛ определялся сочетанием аллелей трех функционально взаимосвязанных цитокинов: G локуса *IL12A* (rs2243115), A локуса *IL13* (rs20541) и C локуса *IL4* (rs2070874) (OR = 2.72). Анализ сочетаний аллелей/генотипов исследованных полиморфных локусов позволил выявить ассоциации полиморфных локусов генов C5 (rs17611), *FASLG* (rs763110) и *TGFB1* (rs1800469), которые проявляли свой эффект только в комбинации с генами *PPBP* (rs352010), *IL12A* (rs568408) и *IL19* (rs2243193).

Оценка прогностической значимости исследованных полиморфных локусов генов цитокинов и молекул воспалительного ответа

По результатам множественного регрессионного и ROC-анализа в первую прогностическую модель риска формирования ХОБЛ вошли такие признаки как возраст и индекс курения и полиморфные варианты генов: комбинация аллеля A локуса *IL19* (rs2243193) и генотипа AA локуса *IL20* (rs2981573), *IL19* (rs2243193), *IL12A* (rs2243115), *PPBP* (rs352010) и *IL4* (rs2070874). Модель характеризовалась высокой предсказательной способностью AUC = 0.895 (табл. 5, рис. 1). Это указывает на высокую способность модели правильно классифицировать лиц с ХОБЛ и без нее. Вторая значимая прогностическая модель включала только полиморфные варианты генов: комбинация аллеля A локуса *IL19* (rs2243193) и генотипа AA локуса *IL20* (rs2981573), *IL19* (rs2243193), *IL12A* (rs2243115), *PPBP* (rs352010) и *IL4* (rs2070874) (табл. 5, рис. 1). ROC-анализ полученной модели показал ее умеренную предсказательную способность AUC = 0.676. Данная модель может эффективно идентифицировать людей, страдающих ХОБЛ.

Таблица 4. Сочетания аллелей и/или генотипов полиморфных локусов генов цитокинов и молекул иммунного ответа, наиболее значимо ассоциированных с ХОБЛ

Сочетания	ХОБЛ (частота)	Контроль (частота)	<i>P</i>	<i>P</i> _{FDR}	OR	CI (95%)
<i>IL20</i> (rs2981573) <i>AA</i> + <i>IL19</i> (rs2243193) <i>A</i> + <i>PPBP</i> (rs352010) <i>C</i>	0.04	0.17	1.68e-11	6.92e-08	0.20	0.12–0.34
<i>IL19</i> (rs2243193) <i>A</i> + <i>IL4</i> (rs2243250) <i>C</i> + <i>PPBP</i> (rs352010) <i>TC</i>	0.07	0.23	2.6e-11	5.34e-08	0.25	0.16–0.39
<i>IL20</i> (rs2981573) <i>AA</i> + <i>IL19</i> (rs2243193) <i>A</i> + <i>IL12A</i> (rs568408) <i>G</i>	0.033	0.16	6.34e-11	3.72e-08	0.18	0.09–0.32
<i>IL20</i> (rs2981573) <i>AA</i> + <i>IL19</i> (rs2243193) <i>A</i>	0.046	0.172	1.22e-10	4.17e-08	0.23	0.14–0.38
<i>IL12A</i> (rs568408) <i>G</i> + <i>IL4</i> (rs2243250) <i>C</i> + <i>PPBP</i> (rs352010) <i>TC</i>	0.12	0.299	1.94e-10	3.98e-08	0.32	0.22–0.46
<i>IL19</i> (rs2243193) <i>A</i> + <i>C5</i> (rs17611) <i>G</i> + <i>PPBP</i> (rs352010) <i>T</i> + <i>FASLG</i> (rs763110) <i>C</i>	0.075	0.212	8.61e-10	9.58e-08	0.30	0.20–0.45
<i>IL4</i> (rs2243250) <i>C</i> + <i>C5</i> (rs17611) <i>G</i> + <i>TGFβ1</i> (rs1800469) <i>C</i> + <i>PPBP</i> (rs352010) <i>T</i>	0.129	0.269	6.19e-08	1.25e-06	0.39	0.27–0.56
<i>IL12A</i> (rs2243115) <i>G</i> + <i>IL13</i> (rs20541) <i>A</i> + <i>IL4</i> (rs2070874) <i>C</i>	0.236	0.102	1e-07	1.72e-06	2.72	1.85–3.97
<i>IL12A</i> (rs568408) <i>GG</i> + <i>IL4</i> (rs2243250) <i>C</i> + <i>PPBP</i> (rs352010) <i>T</i>	0.068	0.189	1.47e-07	2.27e-06	0.31	0.19–0.50
<i>IL12A</i> (rs2243115) <i>G</i> + <i>IL4</i> (rs2070874) <i>C</i>	0.333	0.189	1.77e-07	2.59e-06	2.14	1.59–2.86
<i>IL12RB2</i> (rs3762317) <i>A</i> + <i>PPBP</i> (rs352010) <i>CC</i>	0.696	0.565	1.34e-05	5.87e-05	1.76	1.35–2.29
<i>TGFβ1</i> (rs1800469) <i>C</i> + <i>PPBP</i> (rs352010) <i>CC</i>	0.67	0.542	2.04e-05	8.26e-05	1.72	1.32–2.21
<i>IL12A</i> (rs568408) <i>A</i> + <i>PPBP</i> (rs352010) <i>CC</i>	0.392	0.288	0.000517	0.0012	1.60	1.21–2.09
<i>IL12A</i> (rs568408) <i>A</i> + <i>FASLG</i> (rs763110) <i>CC</i>	0.268	0.184	0.00151	0.0032	1.62	1.19–2.21
<i>IL19</i> (rs2243193) <i>G</i> + <i>IL12A</i> (rs568408) <i>A</i>	0.445	0.346	0.00155	0.0032	1.52	1.16–1.98

Примечание. *P* – уровень значимости по тесту Фишера, *P*_{FDR} – значимость теста после коррекции FDR, OR – отношение шансов, 95% CI – 95% доверительный интервал для OR.

Таблица 5. Предиктивные регрессионные модели развития ХОБЛ

Переменные в уравнении	β	$P_{\text{вальд}}$	OR	95% CI _{OR}
Модель 1				
<i>IL19</i> (rs2243193) <i>A</i> + <i>IL20</i> (rs2981573) <i>AA</i>	−1.05	0.0028731	0.35	0.17–0.7
<i>IL19</i> (rs2243193) <i>GG</i>	0.19	0.056	1.20	0.99–1.46
<i>IL19</i> (rs2243193) <i>A</i>	−0.19	0.056	0.83	0.69–1.01
<i>IL12A</i> (rs2243115) <i>T</i>	−1.44	1.57×10^{-5}	0.24	0.12–0.45
<i>IL12A</i> (rs2243115) <i>GG</i>	1.44		4.23	2.2–8.14
<i>PPBP</i> (rs352010) <i>CC</i>	0.04	0.0167	1.04	0.73–1.5
<i>PPBP</i> (rs352010) <i>CT</i>	−0.53		0.59	0.4–0.88
<i>PPBP</i> (rs352010) <i>TT</i>	0.49		1.63	0.87–3.04
<i>IL4</i> (rs2070874) <i>C</i>	0.79	0.054	2.19	0.99–4.88
<i>IL4</i> (rs2070874) <i>TT</i>	−0.79		0.46	0.21–1.01
Возраст	0.10	1.3×10^{-30}	1.10	1.08–1.12
Индекс курения	0.05	2.83×10^{-20}	1.05	1.04–1.06
Intercept	−5.93	3.33×10^{-17}		
$\chi^2 = 499.415$ $df = 8$ $P = 1.99 \times 10^{-103}$				
Модель 2				
<i>IL19</i> (rs2243193) <i>A</i> + <i>IL20</i> (rs2981573) <i>AA</i>	−1.27	1.09×10^{-5}	0.28	0.16–0.49
<i>IL19</i> (rs2243193) <i>A</i>	−0.22	0.003	0.80	0.69–0.93
<i>IL19</i> (rs2243193) <i>GG</i>	0.22		1.25	1.08–1.44
<i>IL12A</i> (rs2243115) <i>GG</i>	1.18	2.256×10^{-5}	3.25	1.88–5.59
<i>IL12A</i> (rs2243115) <i>T</i>	−1.18		0.31	0.18–0.53
<i>PPBP</i> (rs352010) <i>CC</i>	0.23	0.0001	1.26	0.96–1.65
<i>PPBP</i> (rs352010) <i>CT</i>	−0.50		0.61	0.45–0.83
<i>PPBP</i> (rs352010) <i>TT</i>	0.27		1.31	0.82–2.1
<i>IL4</i> (rs2070874) <i>TT</i>	−1.10	0.003	0.33	0.16–0.69
<i>IL4</i> (rs2070874) <i>C</i>	1.10		3.01	1.44–6.25
Intercept	−0.02	0.974	0.98	

$\chi^2 = 114.817$ $df = 6$ $P = 1.99 \times 10^{-22}$

Примечание. β – бета-коэффициент для переменной, $P_{\text{вальд}}$ – значимость для статистики Вальда (Wald statistic), OR – (exp (β)), χ^2 – тест отношения правдоподобия (likelihood ratio (LR) test), df – число степеней свободы, P – значение для теста отношения правдоподобия.

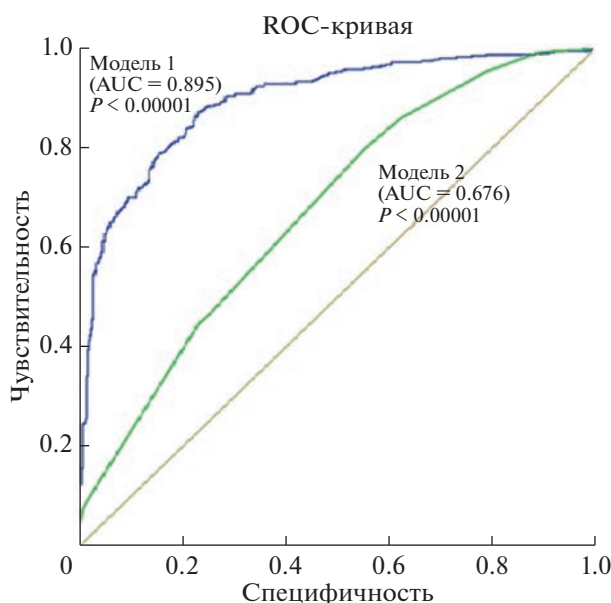


Рис. 1. ROC-кривая для оценки прогностической способности регрессионных моделей для ХОБЛ. AUC — площадь под кривой. Модель 1 (AUC = 0.895) включает гены: комбинация аллеля *A* локуса *IL19* (rs2243193) и генотипа *AA* локуса *IL20* (rs2981573), *IL19* (rs2243193), *IL12A* (rs2243115), *PPBP* (rs352010) и *IL4* (rs2070874) вместе с демографическими показателями — возрастом и индексом курения ($P = 1.99 \times 10^{-103}$, чувствительность — 85.5%, специфичность — 77.5%). Модель 2 (AUC = 0.679) включает только гены: комбинация аллеля *A* локуса *IL19* (rs2243193) и генотипа *AA* локуса *IL20* (rs2981573), *IL19* (rs2243193), *IL12A* (rs2243115), *PPBP* (rs352010) и *IL4* (rs2070874) ($P = 11.99 \times 10^{-22}$, чувствительность — 76.4%, специфичность — 45.1%).

ОБСУЖДЕНИЕ

С целью изучения комбинированного эффекта генов цитокинов и иммунного ответа на риск развития ХОБЛ, а также поиска комплексных клиничко-генетических моделей риска развития заболевания нами проведен анализ ассоциации с ХОБЛ одиннадцати полиморфных локусов генов *IL19*, *IL20*, *IL24*, *PPBP*, *IL4*, *IL4RA*, *C5*, *FAS*, *FASLG*, *TGFb1* в сочетании с ранее изученными полиморфными локусами генов цитокинов *IL12RB2*, *IL12B*, *IL12A*, *IL13* [10].

В результате проведенного исследования, используя последовательный анализ ассоциации сначала отдельных локусов генов цитокинов и иммунного ответа, а затем ген—генных сочетаний полиморфных локусов исследованных генов, нами установлена значимая ассоциация полиморфных вариантов генов *IL19*, *IL20*, *PPBP*, *IL4* с развитием ХОБЛ.

Нами впервые показана ассоциация полиморфных вариантов гена *IL19* (rs2243193) с ХОБЛ; риск развития ХОБЛ был связан с генотипом *GG*, в то время как редкий аллель *A* маркировал пониженный риск развития заболевания. *IL19*, *IL20* и *IL24* принадлежат к семейству цитокина *IL10* [11], локализованы на хромосоме 1q32.1 и имеют сходную структуру. Представители данного семейства цитокинов играют важную роль в развитии ин-

фекционных и воспалительных заболеваний [11]. *IL19* продуцируется макрофагами, моноцитами при их активации внеклеточными патогенами, что может приводить к дополнительной активации других цитокинов (*TNFA*, *IL6*, *IL12*) [12]. Ранее было показано, что полиморфные варианты гена *IL19* ассоциированы с развитием аутоиммунных заболеваний, сердечно-сосудистых осложнений при ревматоидном артрите [13, 14]. Увеличение уровня *IL19* в сыворотке крови коррелировало с прогрессированием ХОБЛ [15]. Вклад полиморфных вариантов гена *IL19* в ХОБЛ ранее не изучался.

Установлена ассоциация с развитием ХОБЛ полиморфного локуса гена *PPBP* (rs352010), кодирующего протромбоцитарный основной белок (*PPBP*), который локализован на участке 4q13.3 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5473>). *PPBP* представляет собой тромбоцитарный фактор роста или тромбоцитарный хемокин, принадлежащий к семейству хемокинов *CXC* (*CXCL7*), который активирует нейтрофилы через рецептор *CXCR2* [16]. Информация о взаимосвязи между ХОБЛ и *PPBP* (*CXCL7*) ограничена, но имеются данные о его вовлеченности в патогенез острого повреждения легких [17]. Данные, полученные в нашем исследовании, подтверждают ассоциацию гена *PPBP* (rs352010) с ХОБЛ, и для интерпрета-

ции результатов необходимы дополнительные функциональные исследования.

Значимые ассоциации с ХОБЛ были выявлены с полиморфными локусами rs2070874 и rs2243250 гена *IL4*. Ген *IL4* локализован на хромосоме 5q31.1 в одном кластере с генами *IL3*, *IL5*, *IL13* и *CSF2*. *IL4* является важным цитокином, участвующем в репарации тканей, опосредует и регулирует различные аллергические и острые воспалительные реакции (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3565>). По данным ряда исследований доказана роль полиморфных вариантов гена *IL4* в патогенезе бронхиальной астмы [18], ХОБЛ [19].

Мультилокусный анализ показал, что аллель *A* локуса *IL19* (rs2243193) и генотип *AA* локуса *IL20* (rs2981573) входят в большинство значимых комбинаций, ассоциированных с пониженным риском развития ХОБЛ, наряду с полиморфными вариантами локусов *IL12A* (rs2243115, rs568408), *PPBP* (rs352010), *IL4* (rs2070874, rs2243250). Генотип *CC* гена *PPBP* (rs352010) входил в состав трех информативных комбинаций, ассоциированных с высоким риском ХОБЛ. Аллель *C* локуса *IL4* (rs2070874) входил в наиболее информативную комбинацию, маркирующую риск развития заболевания, в сочетании с аллелями *G* локуса *IL12A* (rs2243115) и *A* локуса *IL13* (rs20541), функционально с ним связанных цитокинов. При проведении полигенного анализа ассоциаций были выявлены генетические паттерны, значимо ассоциированные с ХОБЛ, которые включали полиморфные локусы генов *FASLG*, *TGFβ1* и *C5*, проявляющие свой эффект только в сочетании с другими генами цитокинов и иммунного ответа. *FASLG* является членом суперсемейства фактора некроза опухоли; его основной функцией является индукция апоптоза, запускаемого связыванием с *FAS* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/356>). Роль генов *FASLG* в развитии ХОБЛ ранее не изучалась, однако имеются данные о ключевой роли *FASL/FAS* — системы в развитии легочного воспаления, повреждения и фиброза [20]. Ген *TGFβ1*, локализованный на хромосоме 19q13.2, кодирует секретируемый лиганд суперсемейства белков трансформирующего фактора роста бета (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7040>), участвующий в регуляции различных клеточных процессов, таких как рост, развитие, дифференцировка, пролиферация, подвижность, адгезия и апоптоз клеток [21]. *TGFβ1* играет ключевую роль в повреждении тканей, вызванном курением, и ремоделировании дыхательных путей [22]. Ген *C5*, кодирует компонент 5 системы комплемента, локализован на хромосоме 9q33.2. *C5* является составной частью системы врожденного иммунитета, которая играет важную роль в развитии

воспалительной реакции, гомеостазе и защите от патогенов (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/727>). Полученные нами результаты свидетельствуют о перспективности полигенного анализа ассоциаций при изучении сложного гетерогенного заболевания, которым является ХОБЛ.

Анализ отдельных факторов риска заболевания не учитывает их взаимодействия, что необходимо для прогнозирования риска развития патологии. По результатам множественного регрессионного и ROC-анализа, в прогностическую модель риска формирования ХОБЛ вошли такие факторы как возраст и индекс курения, а также генетические предикторы, полученные при анализе ген-генных взаимодействий и отдельных локусов: сочетание аллеля *A* локуса *IL19* (rs2243193) и генотипа *AA* локуса *IL20* (rs2981573), а также полиморфные варианты генов функционально взаимосвязанных цитокинов: *IL19* (rs2243193), *IL12A* (rs2243115), *PPBP* (rs352010) и *IL4* (rs2070874).

В заключение следует отметить, что нами выявлены значимые ассоциации с ХОБЛ как отдельных полиморфных локусов, так и комплексные полигенные комбинации исследованных генов цитокинов и иммунного ответа, связанные с развитием заболевания. Впервые в настоящей работе показана значимая ассоциация генов *IL19* (rs2243193) и *PPBP* (rs352010) с ХОБЛ. Используя мультилокусный анализ ассоциаций, мы продемонстрировали наличие ассоциаций с ХОБЛ полиморфных вариантов генов *IL20*, *FASLG*, *TGFβ1*, *C5* только в информативных сочетаниях с аллелями генов *PPBP*, *IL12A* и *IL19*, что может указывать на синергизм исследуемых генов.

Исследование проведено в рамках НИР № 122041400169-2; исследование частично поддержано мегагрантом Правительства Российской Федерации (2020-220-08-2197, соглашение № 075-15-2021-595).

Биологический материал (ДНК) для исследования взят из коллекции “Коллекция биологических материалов человека ИБГ УНЦ РАН” ИБГ УНЦ РАН, поддержанной программой биоресурсных коллекций ФАНО России; работа выполнена с использованием оборудования ЦКП “Биомика” и УНУ “КОДИНК” (ИБГ УФИЦ РАН).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года 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. Barnes P.J. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2016. V. 138. № 1. P. 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.05.011>
2. Hurst J.R., Siddiqui M.K., Singh B. et al. A systematic literature review of the humanistic burden of COPD // *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 2021. V. 16. P. 1303–1314. <https://doi.org/10.2147/COPD.S296696>
3. Silverman E.K. Genetics of COPD // *Annu. Rev. Physiol.* 2020. V. 82. P. 413–431. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021317-121224>
4. Ahmadi A., Ghaedi H., Salimian J. et al. Association between chronic obstructive pulmonary disease and interleukins gene variants: A systematic review and meta-analysis // *Cytokine.* 2019. V. 117. P. 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.02.003>
5. Korytina G.F., Aznabaeva Y.G., Akhmadishina L.Z. et al. The relationship between chemokine and chemokine receptor genes polymorphisms and chronic obstructive pulmonary disease susceptibility in Tatar population from Russia: A case control study // *Biochem. Genet.* 2022. V. 60. № 1. P. 54–79. <https://doi.org/10.1007/s10528-021-10087-2>
6. Korytina G.F., Akhmadishina L.Z., Aznabaeva Y.G. et al. Associations of the NRF2/KEAP1 pathway and antioxidant defense gene polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease // *Gene.* 2019. V. 692. P. 102–112. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.12.061>
7. Ward L.D., Kellis M. HaploReg v4: Systematic mining of putative causal variants, cell types, regulators and target genes for human complex traits and disease // *Nucl. Ac. Res.* 2016. V. 44. № D1. P. D877–D881. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1340>
8. 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>
9. Favorov A.V., Andreewski T.V., Sudomoina M.A. et al. A Markov chain Monte Carlo technique for identification of combinations of allelic variants underlying complex diseases in humans // *Genetics.* 2005. V. 171. № 4. P. 2113–2121. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.048090>
10. Корытина Г.Ф., Зулкарнеев Ш.Р., Азнабаева Ю.Г. и др. Вклад полиморфизмов генов *IL12A*, *IL12B*, *IL13* и *IL12RB2* в развитии хронической обструктивной болезни легких в этнической группе татар // *Якутский мед. журнал.* 2021. Т. 75. № 3. С. 21–25. <https://doi.org/10.25789/YMJ.2021.75.05>
11. Ouyang W., Rutz S., Crellin N.K. et al. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease // *Annu. Rev. Immunol.* 2011. V. 29. P. 71–109. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101312>
12. Azuma Y.T., Fujita T., Izawa T. et al. IL-19 contributes to the development of nonalcoholic steatohepatitis by altering lipid metabolism // *Cells.* 2021. V. 10. № 12. P. 3513. <https://doi.org/10.3390/cells10123513>
13. Wang W., Wang X., Yang K. et al. Association of *BCL2* polymorphisms and the *IL19* single nucleotide polymorphism rs2243188 with systemic lupus erythematosus // *J. Int. Med. Res.* 2021. V. 49. № 5. <https://doi.org/10.1177/03000605211019187>
14. Leonard D., Svenungsson E., Dahlqvist J. et al. Novel gene variants associated with cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis // *Ann. Rheum. Dis.* 2018. V. 77. № 7. P. 1063–1069. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2017-212614>
15. Rong B., Liu Y., Li M. et al. Correlation of serum levels of HIF-1 α and IL-19 with the disease progression of COPD: A retrospective study // *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 2018. V. 13. P. 3791–3803. <https://doi.org/10.2147/COPD.S177034>
16. Brown A.J., Joseph P.R., Sawant K.V. et al. Chemokine CXCL7 heterodimers: structural insights, CXCR2 receptor function, and glycosaminoglycan interactions // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. № 4. P. 748. <https://doi.org/10.3390/ijms18040748>
17. Bdeir K., Gollomp K., Stasiak M. et al. Platelet-specific chemokines contribute to the pathogenesis of acute lung injury // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2017. V. 56. № 2. P. 261–270. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0245OC>
18. Kousha A., Mahdavi Gorabi A., Forouzes M. et al. Interleukin 4 gene polymorphism (–589C/T) and the risk of asthma: A meta-analysis and met-regression based on 55 studies // *BMC Immunol.* 2020. V. 21. № 1. P. 55. <https://doi.org/10.1186/s12865-020-00384-7>
19. Choudhury P., Biswas S., Singh G. et al. Immunological profiling and development of a sensing device for detection of IL-13 in COPD and asthma // *Bioelectrochemistry.* 2022. V. 143. P. 107971. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.107971>
20. Dosreis G.A., Borges V.M., Zin W.A. The central role of Fas-ligand cell signaling in inflammatory lung diseases // *J. Cell Mol. Med.* 2004. V. 8. № 3. P. 285–293. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2004.tb00318.x>
21. Caramori G., Adcock I.M., Di Stefano A. et al. Cytokine inhibition in the treatment of COPD // *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 2014. V. 9. P. 397–412. <https://doi.org/10.2147/COPD.S42544>
22. Tam A., Leclair P., Li L. et al. FAM13A as potential therapeutic target in modulating TGF- β -induced airway tissue remodeling in COPD // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2021. V. 321. № 2. P. L377–L391. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00477.2020>

Polygenic Analysis of Cytokine and Inflammatory Genes Polymorphisms in Chronic Obstructive Pulmonary Disease

G. F. Korytina^{a, *}, Y. G. Aznabaeva^b, O. V. Kochetova^a, T. R. Nasibullin^a,
L. Z. Akhmadishina^a, N. N. Khusnutdinova^a, N. Sh. Zagidullin^b, and T. V. Victorova^b

^a*Institute of Biochemistry and Genetics—Subdivision of the Ufa Federal Research Centre
of the Russian Academy of Sciences (IBG UFRC RAS), Ufa, Russia*

^b*Bashkortostan State Medical University, Ufa, Russia*

*e-mail: guly_kory@mail.ru

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a complex lung disease characterized by progressive air-flow limitation and abnormal inflammatory response of the lungs to inhaled noxious particles or gases. COPD pathogenesis was linked to oxidative stress and systemic inflammation. We aimed to assess the association of cytokines and inflammatory genes polymorphisms and their combinations with COPD. SNPs of inflammatory genes *FASLG* (rs763110), *IL19* (rs2243193), *IL20* (rs2981573), *IL24* (rs291107), *PPBP* (rs352010), *IL4* (rs2243250), *IL4* (rs2070874), *C5* (rs17611), *FAS* (rs1800682), *IL4RA* (rs1805010), *TGFb1* (rs1800469) was genotyped by the real-time polymerase chain reaction (PCR) among 601 COPD patients and 617 controls. Significant associations with COPD in the study group under additive genetic model were identified for *IL19* (rs2243193) ($P = 0.00001$, OR = 0.73), *IL4* (rs2243250) ($P = 0.024$, OR = 1.27), *IL4* (rs2070874) ($P = 0.00001$, OR = 0.62), and for *PPBP* (rs352010) under the recessive model ($P = 0.00001$, OR = 2.34). Using the APSampler algorithm, we obtained gene-gene combinations that remained significantly associated with COPD; *A* allele of *IL19* (rs2243193) and *C* allele of *PPBP* (rs352010) were the core element of the majority of protective patterns associated with COPD. The highest risk of COPD was conferred by combination of alleles: *G* of *IL12A* (rs2243115) with *A* of *IL13* (rs20541) and *C* of *IL4* (rs2070874) (OR = 2.72). The receiver operating characteristic (ROC) analysis resulted in an area under the curve (AUC) of 0.895 (95%CI 0.874–0.916) for model including SNPs: *A* allele of *IL19* (rs2243193) and *AA* genotype of *IL20* (rs2981573) combination, *IL19* (rs2243193), *IL12A* (rs2243115), *PPBP* (rs352010), *IL4* (rs2070874) together with age and smoking pack years, indicating a high ability of the model to correctly classify individuals with and without COPD.

Keywords: chronic obstructive pulmonary disease, cytokine, inflammation, IL19, PPBP, gene–gene interactions.

ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОГО ИНТРОННОГО ВАРИАНТА В ГЕНЕ *F5*, АССОЦИИРОВАННОГО С АБЕРРАНТНЫМ СПЛАЙСИНГОМ И ТЯЖЕЛОЙ ФОРМОЙ НАСЛЕДСТВЕННОГО ДЕФИЦИТА ФАКТОРА V

© 2023 г. О. С. Пшеничникова¹*, Е. В. Яковлева¹, Н. И. Зозуля¹,
Ю. М. Познякова¹, Е. Ю. Демидова¹, В. Л. Сурин¹

¹Национальный медицинский исследовательский центр гематологии, Москва, 125167 Россия

*e-mail: pshenichnikovaolesya@gmail.com

Поступила в редакцию 04.04.2022 г.

После доработки 24.06.2022 г.

Принята к публикации 07.07.2022 г.

Наследственный дефицит фактора свертывания крови V (FV) — это редкое аутосомное наследственное заболевание, которое вызывается дефектами в гене *F5* и проявляется кровотечениями разной степени тяжести. Цель данного исследования — молекулярная и функциональная характеристика нового варианта гена *F5*, приводящего к аберрантному сплайсингу и предельному снижению активности белка, выявленного у пациента с тяжелой формой дефицита FV. Были проведены мутационный скрининг гена *F5* и функциональное исследование для пробанда (FV:C 0.4%), с детства страдающего желудочно-кишечными и посттравматическими кровотечениями, гематомами, экхимозами и дискомфортом в голеностопных суставах. Секвенирование выявило наличие нового гомозиготного варианта гена *F5* NC_000001.10:169519985G>C (или NM_000130.5:c.1297–8C>G). По результатам биоинформатического анализа данный вариант должен приводить к потере акцепторного сайта на границе интрона 8 и экзона 9. Однако анализ мРНК FV показал, что помимо этого он активирует аберрантный сайт сплайсинга на дистанции в семь нуклеотидов от сайта дикого типа и приводит к образованию аномального транскрипта, в котором остается семь нуклеотидов от интрона 8 и формируется преждевременный стоп-кодон. Нормальный транскрипт у исследуемого пациента не выявлялся. Результаты данного исследования свидетельствуют в пользу того, что изменения не только в канонических динуклеотидах сайтов сплайсинга могут в значительной мере нарушать процессинг пре-мРНК.

Ключевые слова: аберрантный сплайсинг, фактор свертывания крови V, дефицит фактора свертывания крови V, ген *F5*, интронные варианты, анализ мРНК.

DOI: 10.31857/S0016675823020108, **EDN:** KYDKCD

Фактор свертывания V (FV, проакцелерин или лабильный фактор) представляет собой гликопротеин размером в 330 кДа, который в активированном состоянии (FVa) выступает в качестве кофактора активированного FX (FXa) в протромбиназном комплексе, ускоряя превращение протромбина в тромбин [1–4]. Он также проявляет антикоагулянтные свойства, участвуя в инактивации FVIII, опосредованной активированным протеином C [2].

Наследственный дефицит FV (OMIM #227400) — это аутосомное рецессивное заболевание крови, частота встречаемости которого в общей популяции составляет 1 : 1000000. Он развивается в результате нарушений в гене *F5*, кодирующем фактор свертывания крови V, и проявляется в виде кровотечений разной степени тяжести (от носовых кровотечений, гематом, легкой синяковости, меноррагий и т.д. при легкой форме до серьезных желудочно-кишечных кровотечений и кровоизлияний в цен-

тральную нервную систему при тяжелой форме) [1, 2, 4–6].

Ген *F5* занимает участок длиной в 74.68 тпн на хромосоме 1q24.2 (GRCh38/hg38) и состоит из 25 экзонов. На данный момент описано 165 различных патогенных вариантов *F5* (HGMD, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>, данные на март 2022 г.), 140 из которых ассоциированы с дефицитом FV. Из них 17 (12%) вариантов относятся к нарушениям сайта сплайсинга. Восемь вариантов, нарушающих сплайсинг, расположены вне консервативных динуклеотидов ($\pm 1-2$) донорных и акцепторных сайтов сплайсинга, но не для всех из них была изучена функциональность нарушений [7–14].

В данном исследовании мы даем молекулярную и функциональную характеристику нового варианта гена *F5*, который приводит к аберрант-

ному сплайсингу и практически полной потере активности белка FV.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве биологического материала использовали цельную венозную кровь, взятую на 6%-ной ЭДТА от пациента с дефицитом FV, его матери и донора без дефицита FV (здоровый контроль) после получения информированного согласия. ДНК выделяли из ядерных клеток периферической крови после селективного лизиса эритроцитов 0.8%-ным раствором хлорида аммония по стандартной методике, включающей обработку додецилсульфатом натрия (0.5%) и протеиназой K (200 мкг/мл) с последующей фенол-хлороформной депротеинизацией и переосаждением этанолом.

Все 25 экзонов, экзон-интронные сочленения и промотор (около 600 пн) гена *F5* амплифицировали в системе PCR Master Mix (ThermoScientific, США) с праймерами, опубликованными ранее [15] или разработанными нами в ходе данного исследования на основании нуклеотидной последовательности гена *F5* GenBank Acc. No. NG_011806 (табл. 1), с 0.01–0.02 мкг геномной ДНК при следующих условиях: 94°C – 1 мин, 62°C – 1 мин, 72°C – 3 мин, 30 циклов. Самый длинный экзон 13 амплифицировали с применением методики long-distance PCR (LD-PCR) в системе Promega GoTaq® Long PCR Master Mix (Promega Corporation, США). Визуализацию продуктов ПЦР проводили с помощью регистрации в УФ-свете после разделения электрофорезом в 6%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) и прокрашивания бромистым этидием. Все праймеры, использованные в работе, синтезировали в ЗАО “Синтол” (Москва, Россия).

ПЦР-фрагменты для секвенирования очищали на колонках Wizard (Promega Corporation). Секвенирование по Сэнгеру проводили в ЦКП “Геном” ИМБ РАН с помощью набора реактивов BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, США) и с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3100Avant (Applied Biosystems).

Названия выявленным вариантам присваивали согласно рекомендациям HGVS (Human Genome Variation Society, <http://varnomen.hgvs.org/>), используя в качестве референса последовательность мРНК NM_000130.5.

Для получения кДНК *F5* использовали в качестве матрицы образцы тотальной РНК, выделенной из ядерных клеток пациента и здорового донора с использованием TRIzol® Reagent (Invitrogen, Нидерланды). Реакцию обратной транскрипции проводили с применением M-MLV Reverse Transcriptase, RNasin® Ribonuclease Inhibitor (Promega Corporation) и праймера F5RT 5'-GGTTTCCCT-

GGTTGAACTGCT-3'. Полученный фрагмент кДНК *F5*, покрывающий часть экзона 8 и полностью экзон 9, амплифицировали при стандартных условиях в системе PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием праймеров F5D 5'-CACAGTACGAAGATGAGTCCTT-3' и F5R 5'-GGTGTGTTCTCCTGCCTGAGGTGA-3'. Секвенирование по Сэнгеру выполняли так же, как было описано выше. Для проведения количественной оценки нормального и мутантного транскрипта выполняли фрагментный анализ того же фрагмента кДНК, амплифицированного с тем же обратным праймером и с прямым праймером (F5DFAM), меченным флуоресцентным красителем (FAM). Длины амплифицированных фрагментов определяли на автоматическом генетическом анализаторе Нанофор 5 (ЗАО “Синтол”, Москва, Россия) со стандартом длин Liz 500 (Applied Biosystems) в программе GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems).

Для определения потенциального влияния выявленного варианта на сайт сплайсинга проводили *in silico* анализ с помощью четырех предсказательных программ: Human Splicing Finder (HSF) [16], NetGene2 [17], Splice Site Prediction by Neural Network (SSPNN) [18] и SpliceAI [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ

История болезни

Пробанд – мужчина, 34 года, страдающий желудочно-кишечными и посттравматическими кровотечениями, гематомами, экхимозами и дискомфортом в голеностопных суставах с детства. Был госпитализирован в ФГБУ “НМИЦ гематологии” Минздрава РФ в 2012 г. со спонтанной напряженной гематомой левого предплечья и с коагулопатией неясного генеза. При обследовании в коагулограмме было выявлено: АЧТВ 71 с, фибриноген 3.0 г/л, протромбин по Квику 48%, FV:C 5%, FII:C 98%, FVII:C 90%; FVIII:C 84%, FIX:C 78%, FX:C 96%, FXI:C 79.9%, vWF:C 130%, FXII:C 101%, XIIa-зависимый фибринолиз 6 мин, агрегация тромбоцитов с ристомисином 85%, агрегация тромбоцитов с коллагеном 73%, агрегация тромбоцитов с адреналином 62%, агрегация тромбоцитов с АДФ 69%. Никто из родственников проблем с кровотечениями не имел. С 1992 г. пациенту по требованию проводили трансфузии свежезамороженной плазмы, криопреципитата и эритроцитарной массы. Дальнейшее обследование выявило значительный дефицит FV (FV:C в плазме составляла 0.4%) при отсутствии ингибитора к FV. Учитывая анамнестические, клинические и лабораторные данные, у больного был диагностирован наследственный дефицит FV. Мать пробанда симптомов не имела, активность FV в плазме была в пределах

Таблица 1. Праймеры, использованные для мутационного скрининга гена *F5*

Целевой фрагмент	Праймер	Последовательность (5'–3')	Размер фрагмента, пн	Источник
Промотор	HCVP-F	CTATGCTGCAGCTTAGCTGG	597	[15]
	HCVP-R	GCTGCAATGAGCTCTAGAGG		
Экзон 1	F5-1D	GACGCTGCCACCCACAGCCT	368	Наш дизайн
	F5-1R	GCCATGACATTGCAAAGGGA		
Экзон 2	F5-2D	CTGGTATTCTACTAGAAGTCTGA	269	Наш дизайн
	F5-2R	CATGTGAATGCCAATTACCCA		
Экзон 3	F5-3D	CTTGCTTAGCAACTCTGCCT	307	Наш дизайн
	F5-3R	CCAGTTGCAAGAGATTTCCT		
Экзон 4	HCFV-4F	ACTGCCCACATGTCTTGATGG	311	[15]
	HCFV-4R	TGACAGAACTCCTGACCATTCC		
Экзон 5	HCFV-5F	CTGCAGTGCTACTGAAAACATG	306	[15]
	HCFV-5R	TCCTTCTTGATAGGGAGTTGC		
Экзон 6	HCFV-6F	GCCTAATCCTTTAGCAATCCCTG	547	[15]
	HCFV-6R	CATTGAGAAGCAAGACTGTCAGG		
Экзон 7	HCFV-7F	GAGTTATTTTATTGTCTTTCTGTCC	241	[15]
	HCFV-7R	GTCTTGAACCTTTGCCCAG		
Экзон 8	HCFV-8F	GCAGAATGTTTAAGCACAAGG	306	[15]
	HCFV-8R	CTATGTAATTTCTCCCATGATTCTG		
Экзон 9	HCFV-9F	GATGACTTCAAAGACAGTGTCC	550	[15]
	HCFV-9R	GGATTCAAGTAGAAGTGAAAGATTC		
Экзон 10	HCFV-10F	ATGACAAGTTAATGGGTGCAGC	541	[15]
	HCFV-10R	CTTGAAGGAAATGCCCCATTA†		
Экзон 11	HCFV-11F	TGGTCTATGCGTCTGTTCTTGAC	250	[15]
	HCFV-11R	CAACCACAGGAATGAAAACTG		
Экзон 12	HCFV-12F	CATAGACTTGGAATTTTAACAG	286	[15]
	HCFV-12R	CAAGCTTCCTCTGTGAGTGTC		
Экзон 13	F5-13D	ATGTCTTTTCCCAGACTTCCA	2961	Наш дизайн
	F5-13R	TGCCCACAATTATCCCCCTGA		
	F5-13d1S*	CCCCACTGAGACACCTCATT		
	F5-13r1S*	CGTATCCCTGTGACATCTGGCTGTA		
	F5-13d2S*	CAGCCCCCAGAATGCCTCAC		
	F5-13d3S*	CAGACAGTGCCCCCAGAGGAACA		
	F5-13d4S*	GTCAGACAAACCTTTCTCCAGCCCT		
	F5-13d5S*	GTCCCTTTCCCAGACCTCAGCCA		
Экзон 14	HCFV-14F	CTGACCTCATGGCACTTATACC	615	[15]
	HCFV-14R	CCGAAGATCTTAGCAGTGCTC		
Экзон 15	HCFV-15F2	GGCCATATCTCACAGGATGG	600	[15]
	HCFV-15R	GTCATCTGAAGAGCTGCATGG		

Таблица 1. Окончание

Целевой фрагмент	Праймер	Последовательность (5'–3')	Размер фрагмента, пн	Источник
Экзон 16	HCFV-16F	AGTGCATGGTAAGCACTTGG	761	[15]
	HCFV-16R2	ACCTGCCAGATTACATCAGC		
Экзон 17	HCFV-17F2	CCTTTCATGGCTAGGTAGG	356	[15]
	HCFV-17R	TCTTAGCAGGGACCTCTTCC		
Экзон 18	HCFV-18F	GAAAGCCTCTTGTGAAGCAGG	388	[15]
	HCFV-18R2	TTCAATGCAATCAGACCATGG		
Экзон 19	HCFV-19F	ATTGAGTCAGAAACATAATCCC	222	[15]
	HCFV-19R	GCATGCTGCACAACCTGTAGG		
Экзон 20	HCFV-20F	AAGGATCTGGTTTTTCCACTGG	366	[15]
	HCFV-20R2	ACCTCAGAGGGTTGATTTTAAGG		
Экзон 21	HCFV-21F	GCAGTGTGTGACTTGTTGAC	241	[15]
	HCFV-21R	AGATTCAGATAGAAATATGCACAC		
Экзон 22	HCFV-22F	TCTTCCTGGAAGTGAATTATCC	360	[15]
	HCFV-22R	TCTTGATTCTTTGAGTGGCAGTG		
Экзон 23	HCFV-23F2	TGAGAACAGTATTTGGCACTTGG	398	[15]
	HCFV-23R	CCAGATCCTCCATGTTTGTGG		
Экзон 24	HCFV-24F	AAGCAAAGGTTTTAACATCTTCC	258	[15]
	HCFV-24R	TCTTTGCCAGATGCCAC		
Экзон 25	HCFV-25F	CAGTCATACAGCTAATACAGACG	630	[15]
	HCFV-25R	GGTCTTAAAGAGTCTCTTCCAGG		

* Праймеры, использованные только для секвенирования.

нормы (78%), клинические и лабораторные данные отца пробанда, к сожалению, были недоступны.

Мутационный анализ

Мутационный анализ с применением секвенирования по Сэнгеру фрагментов, охватывающих все 25 экзонов, экзон-интронные сочленения и около 600 пн 5'-промоторной области гена *F5*, позволил выявить три известных нейтральных SNP (single nucleotide polymorphism) в кодирующих областях: rs1800594 (с.3804 T>C, p.Ser1268Ser) CC; rs549332286 (с.4056 C>T, p.Leu1352Leu) TT; rs6030 (с.5290 A>G, p.Met1764Val) GG, а также множество интронных полиморфизмов по всей протяженности гена, все в гомозиготном состоянии. Кроме того, был обнаружен ранее не описанный гомозиготный вариант с.1297 –8C>G. В международных базах данных (GnomAD, <http://gnomad.broadinstitute.org/>; HGMD, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php>; ClinVar NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>; dbSNP, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) он отсутствовал. У матери пробанда данный вариант (с.1297 –8C>G) был найден в гетерозиготном состоянии.

In silico анализ варианта с.1297 –8C>G

Так как вариант с.1297 –8C>G приходился не на консервативные динуклеотиды сайта сплайсинга ($\pm 1-2$), его влияние на правильное созревание пре-мРНК *F5* оставалось под вопросом. В связи с этим мы провели *in silico* анализ с помощью предсказательных программ. Все четыре использованные программы предсказали его потенциальное влияние на акцепторный сайт на стыке интрона 8 и экзона 9. По оценкам SpliceAI данный вариант с вероятностью 0.84 приводит к потере акцепторного сайта в пределах 50 нуклеотидов от места замены. NetGene2 и SSPNN выявили значительное уменьшение вероятности формирования акцепторного сайта при замене с.1297 –8C>G по сравнению с диким типом (с 0.17 до 0.07 и с 0.94 до 0.74 соответственно). HSF зафиксировал изменение в акцепторном сайте сплайсинга дикого типа, с большой вероятностью влияющее на сплайсинг (изменение значения между диким и мутантным типом составило –97.69%), а также активацию криптического донорного сайта в положении GRCh38:1:169550742-169550750 (изменение зна-

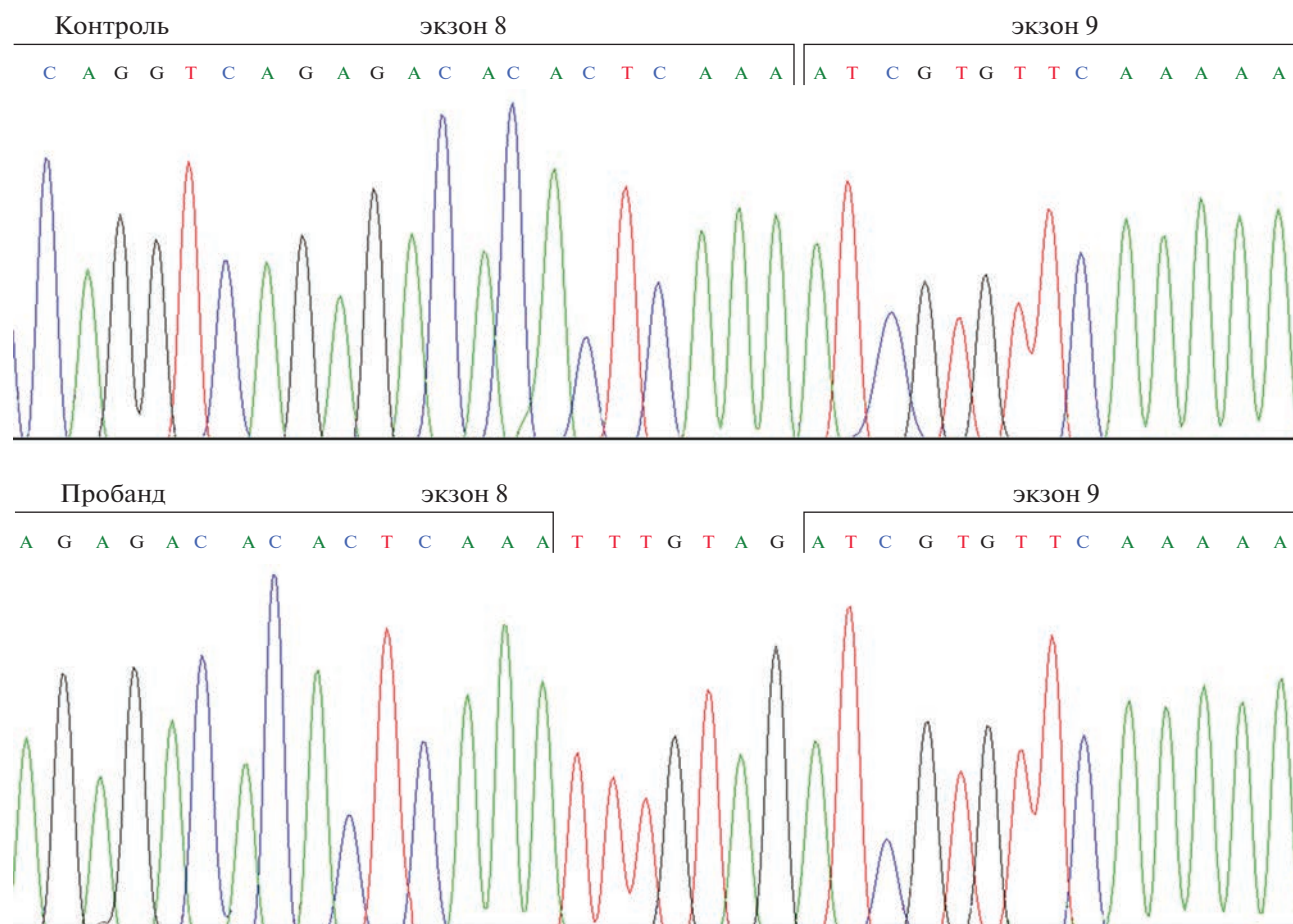


Рис. 1. Полученные с секвенатора электрофореграммы фрагмента кДНК *F5* здорового донора и пробанда, демонстрирующие влияние варианта с.1297 –8C>G на сплайсинг.

чения между диким и мутантным типом составило 56.68%).

Анализ мРНК *F5*

Для того чтобы оценить реальный эффект варианта с.1297 –8C>G на сплайсинг пре-мРНК *F5*, мы амплифицировали и секвенировали по Сэнгеру фрагмент кДНК, покрывающий целиком экзон 9 и часть экзона 8. По результатам секвенирования было показано, что рассматриваемый вариант приводит к возникновению и активации aberrantного сайта сплайсинга, смещенного на семь нуклеотидов в 5'-направлении относительно нормального (рис. 1). Активация этого сайта приводит к формированию более короткого белка FV за счет включения в зрелую мРНК семи концевых нуклеотидов интрона 8, приводящего к сдвигу рамки считывания и возникновению преждевременного стоп-сигнала через 13 кодонов от конца экзона 8.

Следов нормальной мРНК у пробанда обнаружено не было.

Для количественной оценки соотношения мутантной и нормальной мРНК *F5* у пробанда был проведен фрагментный анализ, также показавший полное отсутствие нормального транскрипта (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Данная работа посвящена молекулярно-генетическому исследованию, проведенному для российского пациента с тяжелой формой дефицита FV (уровень активности FV 0.4%). По результатам секвенирования промоторной области, экзона и экзон-интронных сочленений гена *F5* пробанд был гомозиготен практически по всем известным полиморфным позициям. Единственный выявленный потенциально патогенный вариант – с.1297 –8C>G, отсутствующий в базах данных, также находился в гомозиготном состоя-

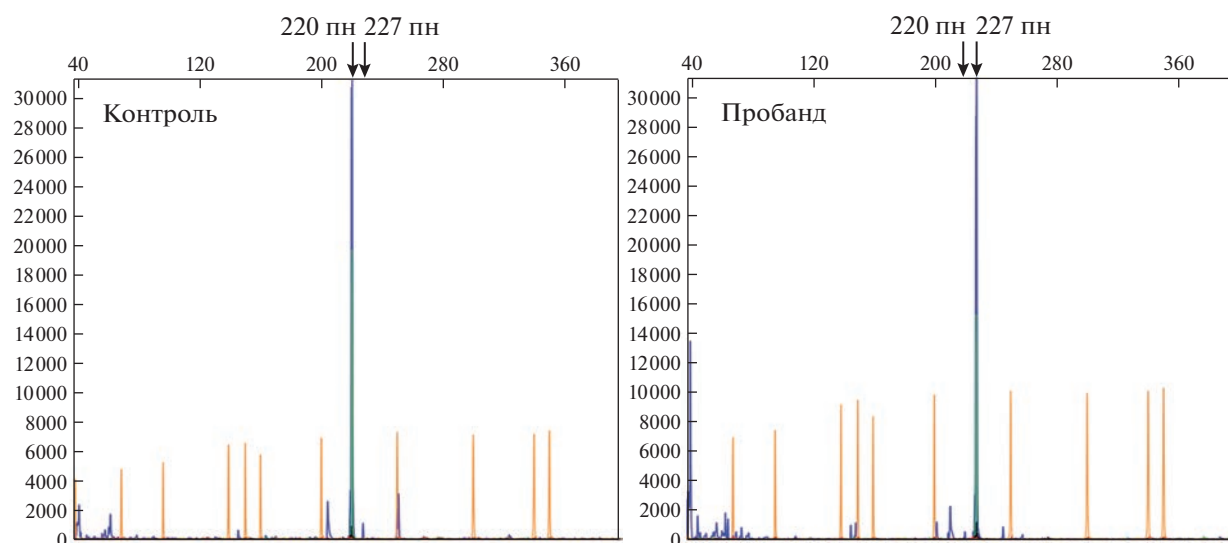


Рис. 2. Количественная оценка нормального (220 пн) и аномального (227 пн) транскриптов при помощи фрагментного анализа.

нии. Согласно рекомендациям ACMG (the American College of Medical Genetics and Genomics) [20] вариант с.1297 –8C>G относится к вероятно патогенным (критерии PM2, PS3, PP3). С помощью четырех программ был выполнен *in silico* анализ возможного влияния найденного варианта на сплайсинг. Все они указывали на нарушение нормального акцепторного сайта сплайсинга, но ни одна из них не выявила формирования нового aberrантного сайта. Согласно предсказаниям программ исследуемый вариант должен приводить к потере экзона 9. Однако результаты анализа мРНК свидетельствуют об активации возникающего вследствие однонуклеотидной замены с.1297 –8C>G aberrантного сайта сплайсинга, приводящего к включению в нормальный транскрипт *F5* семи концевых нуклеотидов интрона 8, сдвигу рамки считывания и формированию преждевременного стоп-кодона. В результате в белке FV остаются только домен A1 и небольшая часть домена A2. В то же время мРНК, содержащие аномальные терминирующие кодоны, могут подвергаться нонсенс-опосредованному распаду (NMD, nonsense-mediated decay) [21], поэтому не исключено, что в нашем случае не синтезируется даже такой укороченный белок. У большинства пациентов с дефицитом FV, несущих гомозиготные варианты, нарушающие сплайсинг, болезнь сопровождается тяжелыми кровотечениями [9, 13, 14, 22, 23], которые были характерны и для исследованного в настоящей работе пациента. Гомозиготность по всем полиморфным пози-

циям может указывать на делецию второй копии гена *F5* или на близкородственный брак родителей пациента, хотя последнее пробанд отрицает. Биоматериал от отца пациента и какие-либо медицинские сведения о нем, к сожалению, были для нас недоступны.

Таким образом, результаты настоящего исследования подтверждают, что замены не только в канонических динуклеотидах сайтов сплайсинга могут в значительной степени нарушать процессинг пре-мРНК. Алгоритмы программ, предсказывающих эффект нуклеотидных замен на сплайсинг, иногда дают не полностью корректные заключения, что подчеркивает важность проведения анализа кДНК для правильной оценки патогенности варианта.

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

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mann K.G., Kalafatis M. Factor V: A combination of Dr Jekyll and Mr Hyde // *Blood*. 2003. V. 101. P. 20–30. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-01-0290>

2. *Duga S., Asselta R., Tenchini M.L.* Coagulation factor V // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004. V. 36. P. 1393–1399. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.08.002>
3. *Paraboschi E.M., Menegatti M., Peyvandi F. et al.* Understanding the impact of aberrant splicing in coagulation factor V deficiency // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 4. P. 910. <https://doi.org/10.3390/ijms20040910>
4. *Paraboschi E.M., Menegatti M., Rimoldi V. et al.* Profiling the mutational landscape of coagulation factor V deficiency // *Haematologica.* 2020. V. 105. № 4. P. e180–e185. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.232587>
5. *Tabibian S., Shiravand Y., Shams M. et al.* A comprehensive overview of coagulation factor V and congenital factor V deficiency // *Semin. Thromb. Hemost.* 2019. V. 45. № 5. P. 523–543. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1687906>
6. *Asselta R., Tenchini M.L., Duga S.* Inherited defects of coagulation factor V: The hemorrhagic side // *J. Thromb. Haemost.* 2006. V. 4. № 1. P. 26–34. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01590.x>
7. *Peyvandi F., Duga S., Akhavan S., Mannucci P.M.* Rare coagulation deficiencies // *Haemophilia.* 2002. V. 8. № 3. P. 308–321. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2516.2002.00633.x>
8. *Nuzzo F., Bulato C., Nielsen B.I. et al.* Characterization of an apparently synonymous *F5* mutation causing aberrant splicing and factor V deficiency // *Haemophilia.* 2015. V. 21. № 2. P. 241–248. <https://doi.org/10.1111/hae.12554>
9. *Dall'Osso C., Guella I., Duga S. et al.* Molecular characterization of three novel splicing mutations causing factor V deficiency and analysis of the *F5* gene splicing pattern // *Haematologica.* 2008. V. 93. № 10. P. 1505–1513. <https://doi.org/10.3324/haematol.12934>
10. *Castoldi E., Duckers C., Radu C. et al.* Homozygous *F5* deep-intronic splicing mutation resulting in severe factor V deficiency and undetectable thrombin generation in platelet-rich plasma // *J. Thromb. Haemost.* 2011. V. 9. № 5. P. 959–968. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04237.x>
11. *Guella I., Paraboschi E.M., van Schalkwyk W.A. et al.* Identification of the first Alu-mediated large deletion involving the *F5* gene in a compound heterozygous patient with severe factor V deficiency // *Thromb. Haemost.* 2011. V. 106. № 2. P. 296–303. <https://doi.org/10.1160/TH11-03-0149>
12. *Kuang S.Q., Hasham S., Phillips M.D. et al.* Characterization of a novel autosomal dominant bleeding disorder in a large kindred from east Texas // *Blood.* 2001. V. 97. № 6. P. 1549–1554. <https://doi.org/10.1182/blood.v97.6.1549>
13. *Lunghi B., Pinotti M., Maestri I. et al.* Evaluation of factor V mRNA to define the residual factor V expression levels in severe factor V deficiency // *Haematologica.* 2008. V. 93. № 3. P. 477–478. <https://doi.org/10.3324/haematol.11952>
14. *Asselta R., Montefusco M.C., Duga S. et al.* Severe factor V deficiency: Exon skipping in the factor V gene causing a partial deletion of the C1 domain // *J. Thromb. Haemost.* 2003. V. 1. № 6. P. 1237–1244. <https://doi.org/10.1046/j.1538-7836.2003.00160.x>
15. *van Wijk R., Nieuwenhuis K., van den Berg M. et al.* Five novel mutations in the gene for human blood coagulation factor V associated with type I factor V deficiency // *Blood.* 2001. V. 98. № 2. P. 358–367. <https://doi.org/10.1182/blood.v98.2.358>
16. *Desmet F.O., Hamroun D., Lalande M. et al.* Human Splicing Finder: An online bioinformatics tool to predict splicing signals // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. P. e67. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp215>
17. *Hebsgaard S.M., Korning P.G., Tolstrup N. et al.* Splice site prediction in *Arabidopsis thaliana* pre-mRNA by combining local and global sequence information // *Nucl. Acids Res.* 1996. V. 24. P. 3439–3452. <https://doi.org/10.1093/nar/24.17.3439>
18. *Reese M.G., Eeckman F.H., Kulp D., Haussler D.* Improved splice site detection in Genie // *J. Comput. Biol.* 1997. V. 4. P. 311–323. <https://doi.org/10.1089/cmb.1997.4.311>
19. *Jaganathan K., Kyriazopoulou Panagiotopoulou S., McRae J.F. et al.* Predicting splicing from primary sequence with deep learning // *Cell.* 2019. V. 176. № 3. P. 535–548. e24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.015>
20. *Richards S., Aziz N., Bale S. et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology // *Genet. Med.* 2015. V. 17. № 5. P. 405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
21. *Hug N., Longman D., Cáceres J.F.* Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway // *Nucl. Acids Res.* 2016. V. 44. № 4. P. 1483–1495. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw010>
22. *Schrijver I., Koerper M.A., Jones C.D., Zehnder J.L.* Homozygous factor V splice site mutation associated with severe factor V deficiency // *Blood.* 2002. V. 99. P. 3063–3065. <https://doi.org/10.1182/blood.v99.8.3063>
23. *Fu Q.H., Zhou R.F., Liu L.G. et al.* Identification of three *F5* gene mutations associated with inherited coagulation factor V deficiency in two Chinese pedigrees // *Haemophilia.* 2004. V. 10. P. 264–270. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2004.00896.x>

Characterization of Novel *F5* Intronic Variant Associated with Aberrant Splicing and Severe Factor V Deficiency

O. S. Pshenichnikova^{a, *}, E. V. Yakovleva^a, N. I. Zozulya^a,
Yu. M. Poznyakova^a, E. Yu. Demidova^a, and V. L. Surin^a

^a*National Medical Research Center for Hematology, Moscow, 125167 Russia*

^{*}*e-mail: pshenichnikovaolesya@gmail.com*

Congenital factor V deficiency is a rare autosomal recessive bleeding disorder, caused by defects in *F5* gene and associated with bleeding manifestations of variable severity. In this study we report molecular and functional characterization of a novel *F5* variant which causes aberrant splicing and significantly reduces protein expression in a patient with severe FV deficiency. We performed *F5* mutation screening and functional study in a proband (FV:C 0.4%) with a history of gastrointestinal bleeding, post-traumatic bleeding, hematomas, ecchymoses, and discomfort in ankle joints since infancy. Sequencing revealed a novel homozygous *F5* gene variant NC_000001.10:169519985G>C (or NM_000130.5:c.1297 –8C>G). Bioinformatics sequence analysis predicted that this variant would lead to the acceptor site loss of the intron 8/exon 9 junction. However mRNA analysis identified, that it also activated the aberrant splice site located 7 nucleotides upstream of the normal one and was associated with the production of an anomalous *F5* transcript with retention of seven nucleotides of intron 8 resulting in a premature stop codon. We revealed no traces of normal transcript in the patient. Our findings confirm that not only changes in canonical splicing dinucleotides could significantly disrupt the splicing sites and impair pre-mRNA processing.

Keywords: aberrant splicing, coagulation factor V, factor V deficiency, *F5* gene, intronic variants, mRNA analysis.

МЕЖГЕННЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СЕТИ ЗАБОЛЕВАНИЙ С НАРУШЕНИЯМИ КОГНИТИВНЫХ ФУНКЦИЙ ЧЕЛОВЕКА

© 2023 г. А. В. Бочарова¹, *, В. А. Степанов¹

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

*e-mail: anna.bocharova@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 08.04.2022 г.

После доработки 18.05.2022 г.

Принята к публикации 31.05.2022 г.

Расстройства неврологического и психического спектра, такие как шизофрения, болезнь Альцгеймера, биполярное расстройство, болезнь Паркинсона, представляют собой сложно наследуемые многофакторные заболевания человека с нарушениями когнитивных функций и являются социально значимыми патологиями, представляющими серьезную проблему для мирового здравоохранения. Данные заболевания отличаются многоуровневым характером реализации генетической информации, и в формировании окончательного фенотипа принимает участие целый ряд совместно действующих генов. В связи с этим для понимания молекулярных механизмов, лежащих в основе изучаемой патологии, следует применить анализ биологических сетей, направленный на выявление взаимодействующих генов, продукты которых приводят к развитию заболевания. В настоящем исследовании для реализации такого подхода в отношении фенотипов с нарушениями когнитивных функций человека были использованы различные онлайн-ресурсы и базы данных: WebGestalt, GeneOntology, STRING. С помощью биоинформатических инструментов была получена сеть белок-белковых взаимодействий, где выделяются две подсети, одна из которых участвует в риске развития шизофрении, а другая — в риске развития болезни Альцгеймера.

Ключевые слова: когнитивные функции, когнитивные нарушения, шизофрения, болезнь Альцгеймера, биологические сети.

DOI: 10.31857/S0016675823020030, **EDN:** KXCFZW

Проблема когнитивных нарушений (КН) — важная фундаментальная задача, поскольку нарушение внимания, зрительной памяти, мыслительных процессов и других когнитивных функций существенно снижает качество жизни пациентов [1]. КН являются состояниями полиэтиологической природы, которые развиваются при различных психических, неврологических и соматических заболеваниях. Поскольку когнитивные функции связаны с общей деятельностью головного мозга в целом, КН закономерно развиваются при самых разных очаговых и диффузных поражениях головного мозга. Несмотря на значительные достижения в понимании механизмов развития КН, большая часть проявлений риска развития этих нарушений у больных остается необъясненной. Невзирая на это, за последние годы накоплен обширный фактический материал о генетических основах заболеваний с различными нарушениями когнитивных функций. Так, для биполярного расстройства, аутизма, шизофрении, большого депрессивного расстройства оценка наследуемости, полученная при по-

мощи различных генетических подходов, включая близнецовый и семейный анализы, варьирует в пределах от 30 до 80% [2]. Особенно часто КН возникают в пожилом возрасте. Последние данные по оценке генетического риска при болезни Паркинсона, при которой признаки явного когнитивного дефицита обнаруживаются у 15–25% больных, были получены в результате масштабного метаанализа и объясняли 16–36% наследственного риска этого заболевания [3]. В то же время наследственность для болезни Альцгеймера, которая является самой частой причиной деменции, оценивается в пределах от 58 до 79% [4]. Все эти данные свидетельствуют, что наследственность — один из ведущих факторов в развитии КН при психиатрических и неврологических заболеваниях.

Неврологические и психические заболевания, к которым относятся шизофрения (ШЗ), болезнь Альцгеймера (БА), биполярное расстройство, болезнь Паркинсона, представляют собой комплексные фенотипы с нарушениями когнитивных функций и отличаются многоуровневым характером ре-

ализации генетической информации. Причинами таких заболеваний могут быть многочисленные взаимодействующие факторы, в том числе и сетевой природы. В связи с этим общепринятый ассоциативный анализ генетического маркера с фенотипом не позволяет прицельно говорить о нарушении определенного молекулярного пути при развитии заболевания. Анализ биологических сетей, направленный на выявление взаимодействующих генов и белков, которые приводят к патогенезу заболевания, обеспечивает понимание на уровне молекулярных механизмов, лежащих в основе изучаемой патологии. Цель настоящего исследования заключалась в выявлении взаимосвязи генов, ассоциированных с заболеваниями с нарушениями когнитивных функций человека, путем их функциональной аннотации и анализа белок-белковых взаимодействий с помощью биоинформатических подходов. Данная работа является продолжением исследований коллектива авторов НИИ медицинской генетики ТНИМЦ (г. Томск), связанных с генетикой заболеваний, приводящих к нарушению когнитивных функций человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В наших предыдущих работах были получены результаты в рамках ассоциативного анализа однонуклеотидных полиморфных вариантов генов с фенотипом ШЗ или БА, с помощью метода снижения многомерной размерности выявлены модели межгенных взаимодействий, также были идентифицированы отличия в частотах генетических маркеров в популяциях Северной Евразии [5–11]. Для настоящего исследования при формировании списка генов мы опирались на эти данные (табл. 1). Для выявления взаимосвязи между генами, их взаимодействий с другими генами риска развития ШЗ и БА были проведены анализ функциональных связей генов и анализ белок-белковых взаимодействий с помощью онлайн-ресурсов WebGestalt [12], STRING [13]. Для оценки принадлежности генов к молекулярным функциям, биологическим процессам или клеточным компонентам были использованы алгоритмы, реализованные в базе данных Gene Ontology [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе генов, вовлеченных в биологические процессы, было выявлено десять категорий Gene Ontology с минимальным пороговым уровнем значимости $p < 0.00005$ (табл. 2). В восьми процессах из 10 наблюдалось участие трех генов: ген кластерина (*CLU*), ген фосфатидилинозитол-связывающего белка сборки клатрина (*PICALM*), ген белка аполипопротена Е (*APOE*), а гены нейрографина (*NRGN*) и реллина (*RELN*) участвовали в процессе регуляции долговременной синаптической

потенциации (GO:1900273). Из анализа биологических процессов видно, что гены играют регуляторную роль в процессах, лежащих в основе патогенеза БА и ШЗ. При этом девять категорий были связаны с процессами регуляции образования, выведения и катаболизма бета-амилоида (*Aβ*) или белка-предшественника амилоида (*APP*), а также с регуляцией долговременной синаптической потенциации, которая играет важную роль в механизмах синаптической пластичности. Долговременная потенциация дает нервной системе человека возможность адаптироваться к изменяющимся условиям внешней среды и совместно с процессом долговременной депрессии лежит в основе клеточных механизмов памяти и обучения [15, 16]. Для болезни Альцгеймера характерны нарушения в долговременной синаптической потенциации: наблюдается меньшее долговременное увеличение амплитуды постсинаптического потенциала действия в ответ на тетаническое раздражение [17] и меньшая продолжительность такого увеличения [18]. Это происходит из-за накопления *Aβ* в неокортексе и гиппокампальной формации. Таким образом, в этих структурно-функциональных отделах мозга, ответственных за декларативную память, происходят патологические изменения, связанные с подавлением долговременной синаптической потенциации, зависимой от ионотропных рецепторов глутамата (NMDA-рецепторы).

В табл. 3 представлены восемь молекулярных функций с минимальным пороговым уровнем значимости $p < 0.005$, в которые были вовлечены гены, вовлеченные в патогенез заболеваний с нарушениями когнитивных функций. Выделяются четыре гена, которые участвовали в выполнении каждой молекулярной функции: гены белка аполипопротена Е (*APOE*), кластерина (*CLU*), фосфатидилинозитол-связывающего белка сборки клатрина (*PICALM*) и нейрографина (*NRGN*). Все функции касались связывания какого-либо белка: тау, *Aβ*, липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), кальмодулина, фосфатидилинозитола, фосфолипида.

Анализ с помощью онлайн-ресурса WebGestalt выявил девять клеточных компонентов базы данных Gene Ontology, в которые вовлечены не менее восьми исследуемых генов (табл. 4), описывающих в большей части нервные клетки и их структуру: нейрон, дендрит. Четыре категории клеточных компонентов включают по 10 генов из анализируемых нами, три категории — по девять генов, две категории содержат по восемь генов. Семь генов повторяются во всех девяти клеточных компонентах: *LSM1*, *CACNA1C*, *BRD1*, *NRGN*, *KCNB2*, *ZNF804A*, *APOE*.

Сеть белок-белковых взаимодействий строили с помощью онлайн-ресурса STRING [13]. Анализ сети показал высокую степень взаимодействий между изучаемыми белками ($p < 1.05 \times 10^{-13}$). Боль-

Таблица 1. Характеристика генов

№	Полное название гена	Обозначение гена	Ассоциация по данным GWAS
1	contactin associated protein 2	<i>CNTNAP2</i>	БА
2	apolipoprotein E	<i>APOE</i>	БА
3	mitochondrial pyruvate carrier 2	<i>MPC2</i>	ШЗ
4	coiled-coil domain containing 60	<i>CCDC60</i>	ШЗ
5	5'-nucleotidase, cytosolic II	<i>NT5C2</i>	ШЗ
6	VRK serine/threonine kinase 2	<i>VRK2</i>	ШЗ
7	zinc finger protein 804A	<i>ZNF804A</i>	ШЗ
8	Transcription factor 4	<i>TCF4</i>	ШЗ
9	Sorting nexin 29	<i>SNX29</i>	ШЗ
10	<i>LOC105373605</i>	<i>LOC105373605</i>	БА
11	bromodomain containing 1	<i>BRD1</i>	ШЗ
12	dachshous cadherin-related 2	<i>DCHS2</i>	БА
13	clusterin	<i>CLU</i>	БА
14	NFKB activating protein-like	<i>NKAPL</i>	ШЗ
15	LSM1 homolog, mRNA degradation associated	<i>LSM1</i>	ШЗ
16	POM121 transmembrane nucleoporin-like 2	<i>POM121L2</i>	ШЗ
17	Rho GTPase activating protein 31	<i>ARHGAP31</i>	ШЗ
18	neurogranin	<i>NRGN</i>	ШЗ
19	CUB and Sushi multiple domains 1	<i>CSMD1</i>	КС
20	CD33 molecule	<i>CD33</i>	ШЗ
21	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 1	<i>ACSM1</i>	ШЗ
22	apolipoprotein C1	<i>APOC1</i>	БА
23	cell adhesion associated, oncogene regulated	<i>CDON</i>	БА
24	calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C	<i>CACNA1C</i>	ШЗ
25	phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein	<i>PICALM</i>	БА
26	nectin cell adhesion molecule 2	<i>NECTIN2 (PVRL2)</i>	БА
27	<i>LOC105375630</i>	<i>LOC105375630</i>	ШЗ
28	reelin	<i>RELN</i>	ШЗ
29	<i>LOC105373605</i>	<i>LOC105373605</i>	БА

Примечание. ШЗ — шизофрения, БА — болезнь Альцгеймера, КС — когнитивные способности; GWAS — полногеномные ассоциативные исследования.

шая часть белков образуют кластер, который состоит из 12 функционально взаимодействующих протеинов (рис. 1), связи между которыми основаны на коэкспрессии, опубликованных данных и результатах анализа баз данных.

Несмотря на то что сеть едина, в ней выделяются две подсети, которые состоят из пяти и шести белков. Первая подсеть содержит шесть узлов (NT5C2, CACNA1C, CSMD1, ZNF804A, VRK2, NRGN) и 11 ребер (взаимодействий), центральным является белок, связывающий цинковый палец 804A (ZNF804A) с пятью ребрами. Гены, кодирующие белки этой подгруппы, являются генами-кандидатами в первую очередь для шизофрении по базе данных HuGE Navigator [19].

Белок ZNF804A, занимающий центральное место в данной подсети, имеет домен цинкового пальца C2H2-типа на N-конце [20]. Домены данного типа характерны для транскрипционных факторов и способны связываться с ДНК, РНК и белками [21]. Белки, содержащие домен цинкового пальца C2H2-типа, появились в процессе эволюции рано и найдены у многих эукариотических организмов [22]. Белок ZNF804A способствует транскрипционной регуляции и сплайсингу пре-мРНК генов, вовлеченных в процессы, лежащие в основе шизофрении, — такие как развитие нервной системы. Вероятно, генетические варианты гена *ZNF804A* могут способствовать риску развития заболевания посредством нарушения регуляции

Таблица 2. Биологические процессы из базы данных Gene Ontology

№	Наименование биологического процесса	<i>p</i>	Вовлеченные гены
1	Отрицательная регуляция катаболического процесса APP (GO:1902992)	4.2×10^{-7}	<i>CLU, PICALM, APOE</i>
2	Выведение Aβ (GO:0097242)	1.7×10^{-7}	<i>CLU, PICALM, APOE</i>
3	Регуляция образования Aβ (GO:1902003)	1.9×10^{-6}	<i>CLU, PICALM, APOE</i>
4	Регуляция катаболического процесса APP (GO:1902991)	3.8×10^{-6}	<i>CLU, PICALM, APOE</i>
5	Образование Aβ (GO:0034205)	4.2×10^{-6}	<i>CLU, PICALM, APOE</i>
6	Катаболический процесс APP (GO:0042987)	9.4×10^{-6}	<i>CLU, PICALM, APOE</i>
7	Регуляция долговременной синаптической потенциации (GO:1900271)	1.1×10^{-5}	<i>NRGN, RELN, APOE</i>
8	Метаболический процесс Aβ (GO:0050435)	1.4×10^{-5}	<i>CLU, PICALM, APOE</i>
9	Метаболический процесс APP (GO:0042982)	2.9×10^{-5}	<i>CLU, PICALM, APOE</i>
10	Регуляция образования амилоидных фибрилл (GO:1905906)	3.8×10^{-5}	<i>CLU, APOE</i>

Примечание. *p* – уровень значимости, полученный с помощью онлайн-ресурса WebGestalt, APP – предшественник бета-амилоида, Aβ – бета-амилоид.

Таблица 3. Молекулярные функции из базы данных Gene Ontology

№	Наименование молекулярной функции	<i>p</i>	Вовлеченные гены
1	Связывание рецептора липопротеиновой частицы (GO:0070325)	1.8×10^{-8}	<i>CLU, PICALM, RELN, APOE</i>
2	Связывание с липопротеиновыми частицами низкой плотности (GO:0050750)	1.6×10^{-6}	<i>CLU, PICALM, APOE</i>
3	Связывание белка tau (GO:0048156)	1.7×10^{-5}	<i>CLU, PICALM, APOE</i>
4	Связывание Aβ (GO:0001540)	9.1×10^{-5}	<i>CLU, PICALM, APOE</i>
5	Связывание фосфолипидов (GO:0005543)	0.001	<i>SNX29, PICALM, NRGN, APOE</i>
6	Связывание кальмодулина (GO:0005516)	0.001	<i>CACNA1C, SPA17, NRGN</i>
7	Связывание фосфатидилинозитола (GO:0035091)	0.002	<i>SNX29, PICALM, NRGN</i>
8	Связывание белков (GO:0001540)	0.004	<i>CLU, PICALM, APOE</i>

Примечание. *p* – уровень значимости, полученный с помощью онлайн-ресурса WebGestalt, Aβ – бета-амилоид.

транскрипции и сплайсинга пре-мРНК, связанной с *ZNF804A*. Белок *ZNF804A* локализован в синапсах и играет важную роль в образовании аксона и структуры дендритных шипиков [23]. Накапливаются данные о значении дендритных шипиков как важной функциональной единицы при психических и неврологических расстройствах, включая шизофрению, биполярное расстройство, аутизм, а также болезнь Альцгеймера [24, 25]. Показано влияние белка *ZNF804A* на пластичность дендритных шипиков, в том числе на зрелые грибовидные шипики дендритов, которые необходимы в процессе познания [26, 27]. Так, повышенная экспрессия гена *ZNF804A* коррелирует с более низким риском ШЗ и с более высокой плотностью грибовидных шипиков дендритов [28]. Все это свидетельствует об обоснованном выделении белка *ZNF804A* в качестве центрального в подсети, связанной с фенотипом шизофрении.

Другая подсеть образована пятью белками (*PICALM, CLU, CD33, APOE, PVRL2*) и содержит восемь ребер. Здесь центральный белок – аполипопротеин Е с пятью ребрами. В эту подгруппу входят белки, гены которых являются кандидатными по базе данных HuGE Navigator [19] в первую очередь для болезни Альцгеймера.

Аполипопротеин Е является самым сильным фактором риска развития БА. Белок *APOE* регулирует метаболизм липопротеинов и выполняет важные функции в центральной нервной системе, а именно отвечает за транспорт холестерина, нейропластичность и воспаление. *APOE* связывается с Aβ и влияет на клиренс растворимого Aβ и агрегацию Aβ. Он также косвенно регулирует метаболизм Aβ путем взаимодействия с рецепторами. С тех пор как в 1993 г. были обнаружены ассоциации гена *APOE* и болезни Альцгеймера [29–31], проведены сотни исследований для изучения воз-

Таблица 4. Клеточные компоненты из базы данных Gene Ontology

№	Наименование клеточного компонента	<i>p</i>	Вовлеченные гены
1	Соматодендритный компартмент (GO:0036477)	$3,1 \times 10^{-10}$	<i>CLU, LSM1, CACNA1C, PICALM, NRG1, BRD1, KCNB2, ZNF804A, RELN, APOE</i>
2	Дендрит (GO:0030425)	$6,1 \times 10^{-10}$	<i>CLU, LSM1, CACNA1C, NRG1, BRD1, KCNB2, ZNF804A, RELN, APOE</i>
3	Дендритное дерево (GO:0097447)	$6,3 \times 10^{-10}$	<i>CLU, LSM1, CACNA1C, NRG1, BRD1, KCNB2, ZNF804A, RELN, APOE</i>
4	Тело нервных клеток (GO:0043025)	$3,4 \times 10^{-9}$	<i>LSM1, CACNA1C, PICALM, NRG1, BRD1, KCNB2, ZNF804A, APOE</i>
5	Тело клетки (GO:0044297)	$9,1 \times 10^{-9}$	<i>LSM1, CACNA1C, PICALM, NRG1, BRD1, KCNB2, ZNF804A, APOE</i>
6	Часть проекции клетки (GO:0044463)	$5,9 \times 10^{-8}$	<i>CLU, LSM1, CACNA1C, SPA17, NRG1, BRD1, KCNB2, ZNF804A, RELN, APOE</i>
7	Плазматическая мембрана, ограниченная частью клеточной проекции (GO:0120038)	$5,9 \times 10^{-8}$	<i>CLU, LSM1, CACNA1C, SPA17, NRG1, BRD1, KCNB2, ZNF804A, RELN, APOE</i>
8	Часть нейрона (GO:0097458)	$3,0 \times 10^{-7}$	<i>CLU, LSM1, CACNA1C, PICALM, NRG1, BRD1, KCNB2, ZNF804A, RELN, APOE</i>
9	Проекция нейрона (GO:0043005)	$4,2 \times 10^{-7}$	<i>CLU, LSM1, CACNA1C, NRG1, BRD1, KCNB2, ZNF804A, RELN, APOE</i>

Примечание. *p* – уровень значимости, полученный с помощью онлайн-ресурса WebGestalt.

можной роли гена *APOE* в риске развития неврологических заболеваний, психических расстройств и связанных с ними эндофенотипов [32–35]. Были проведены метаанализы, обнаружившие важные доказательства роли *APOE* в неврологических заболеваниях и психических расстройствах [36–39].

Рис. 1 демонстрирует, что эти две подсистемы белков, одна из которых участвует в риске развития ШЗ, а другая – в риске развития БА, связаны между собой как мостом белком рилином, который продуцируется нейронами и является сигнальной молекулой для формирования связей между ними. Рилин участвует в каскаде цитоплазматических событий, которые контролируют миграцию нейронов во время развития мозга, и он необходим для правильного развития и пластичности коры головного мозга и регулирует пластичность синапсов, нейротрансмиссию и память взрослого человека. Предположительно рилин играет значительную роль как в развитии болезни Альцгеймера, так и при развитии психических расстройств [40–42]. Так, в результате генетических и биохимических исследований были получены доказательства изменений передачи сигналов при БА, опосредованных рилином. Эти данные позволяют предположить, что снижение продукции данного белка может способствовать началу и прогрессированию БА путем нарушения синаптических функций, стабильности цитоскелета и правильного аксонального транспорта [43–45]. Получены доказательства, определяющие роль рилина в модуляции патогенетических процессов, лежащих в

основе БА [46]. В результате исследований были подтверждены изменения структуры рилина при БА, а также его роль во внутриклеточных сигнальных путях, связанных с выживанием нейронов и физиологическими процессами головного мозга. Были описаны активная роль рилина в восстановлении когнитивных функций и редукции волокон бета-амилоидного пептида *in vitro*, а также сокращение амилоидных отложений в мозгу животных моделей с болезнью Альцгеймера [46]. Функции белка рилина, связанные с улучшением синаптической пластичности и уменьшением фосфорилирования тау-белка, могут рассматриваться как возможный механизм уменьшения последствий нейродегенеративного процесса и защиты нейронов головного мозга от повреждений. Кроме того, исследования *in vitro* подтверждают способность рилина изменять ненормальное распределение нейрофиламентов и тау-белка в дендритах, что прослеживается на первых этапах нейродегенеративных процессов при БА. И наконец, гиперэкспрессия рилина оказывает влияние на область когнитивных и физиологических функций, смягчая их ограниченность в животных моделях с тау-патологиями [47]. С другой стороны, с эпигенетическими функциями гена *RELN* связано развитие нейромедиаторных систем, в частности дофаминергической, глутаматергической и ГАМК-ергической, которые участвуют в развитии патологического процесса при ШЗ. И на сегодняшний день считается, что для больных ШЗ характерно гиперметилирование гена *RELN* в головном мозге [48,

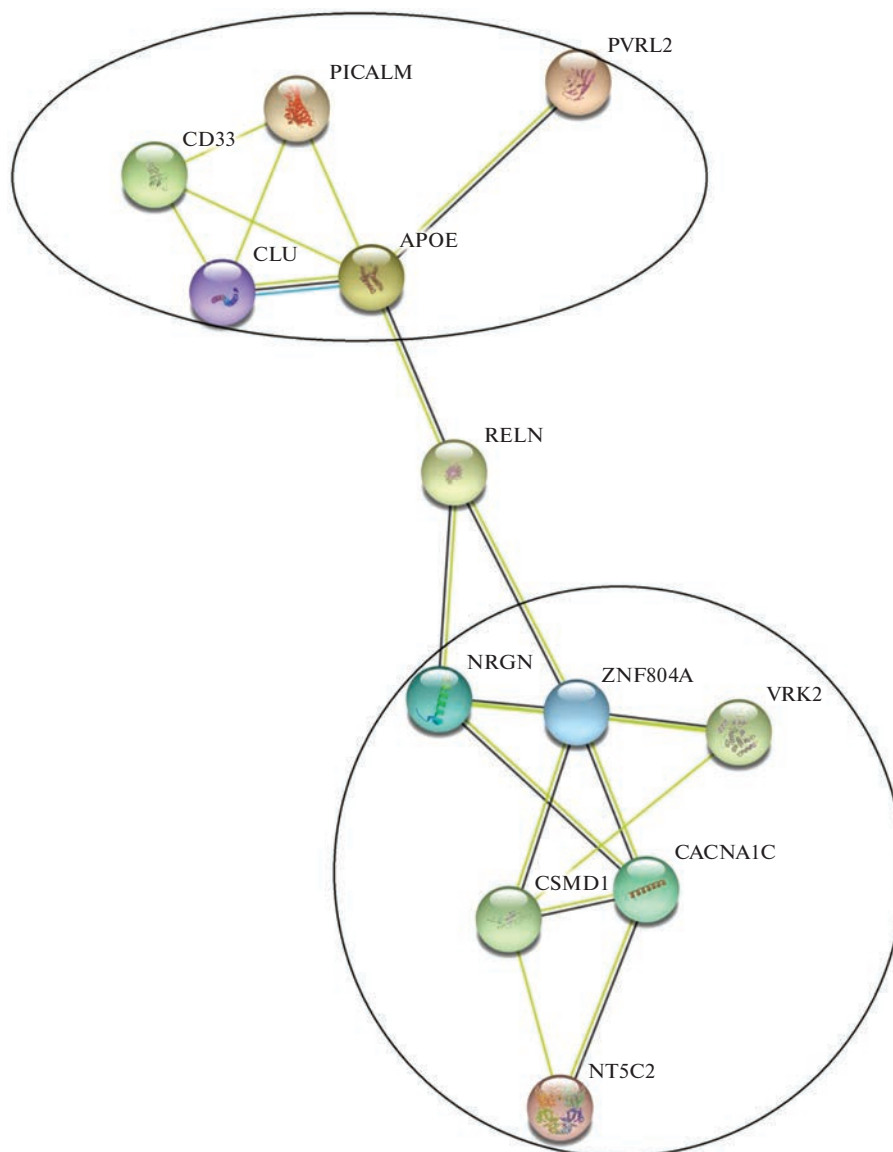


Рис. 1. Характеристика белок-белковых взаимодействий продуктов 12 генов, полученная с помощью ресурса STRING. Цвет соединяющих линий характеризует типы взаимодействий: светло-зеленый — взаимодействие, выявленное при интеллектуальном анализе текста; черный — коэкспрессия; голубой — известные взаимодействия, подтвержденные в базах данных.

49]. В других работах отмечается, что снижение матричной РНК *RELN* может способствовать уменьшению длины дендритов и понижению плотности дендритных шипиков в префронтальной и других областях коры, гиппокампе, гипоталамусе, миндалине, продолговатом мозге, а также в среднем мозге [50, 51]. Таким образом, понижение экспрессии рилина искажает направление нейронных связей, функция которых при этом нарушается. В целом накопленные данные указывают на то, что нарушения в передаче сигналов рилина и компонентов его сигнального пути вовлечены в нарушения когнитивных функций человека, которые

характерны для БА, ШЗ и расстройства аутистического спектра.

В заключение хочется отметить, что ассоциации однонуклеотидных полиморфных вариантов генов с тем или иным фенотипом, полученные с помощью полногеномных ассоциативных исследований, не объясняют биологические механизмы сложных многофакторных заболеваний, таких как шизофрения и болезнь Альцгеймера. Функциональная роль ассоциированных маркеров по большей части неизвестна, поскольку в отличие от моногенных заболеваний, возникающих в результате мутации главным образом в кодирующих участках гена, подавляющее большинство SNP, которые

были идентифицированы для многофакторных заболеваний, расположены в некодирующих интронных и межгенных областях. Это диктует необходимость анализа не только отдельных SNP, но и межгенных взаимодействий, молекулярных путей и белок-белковых сетей, которые имеют отношение к фенотипам ШЗ и БА. Использование различных биоинформатических инструментов, включая STRING и Gene Ontology, позволило нам выявить комбинации генов и белков, которые не были обнаружены при проведении только репликативного анализа ассоциаций, сфокусированного на отдельных SNP-маркерах.

Исследование выполнено за счет средств Государственного задания по теме ФНИ № 122020200083-8.

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

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Morozova A., Zorkina Y., Abramova O. et al. Neurobiological highlights of cognitive impairment in psychiatric disorders // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 3. P. 1217. <https://doi.org/10.3390/ijms23031217>
2. Pettersson E., Lichtenstein P., Larsson H. et al. Genetic influences on eight psychiatric disorders based on family data of 4408646 full and half-siblings, and genetic data of 333748 cases and controls // *Psychol. Med.* 2019. V. 49. № 7. P. 1166–1173. <https://doi.org/10.1017/S0033291718002039>
3. Nalls M.A., Blauwendraat C., Vallerga C.L. et al. Identification of novel risk loci, causal insights, and heritable risk for Parkinson's disease: A meta-analysis of genome-wide association studies // *Lancet Neurol.* 2019. V. 18. № 12. P. 1091–1102. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30320-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30320-5)
4. Gatz M., Reynolds C.A., Fratiglioni L. et al. Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease // *Arch. Gen. Psychiatry.* 2006. V. 63. № 2. P. 168–174. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.63.2.168>
5. Степанов В.А., Бочарова А.В., Марусин А.В. и др. Репликативный анализ ассоциаций генетических маркеров когнитивных признаков с болезнью Альцгеймера в российской популяции // *Мол. биология.* 2014. Т. 48. № 6. С. 952–962. <https://doi.org/10.7868/S0026898414060160>
6. Степанов В.А., Бочарова А.В., Садуакасова К.З. и др. Репликативное исследование подверженности шизофрении с ранним началом у казахов // *Генетика.* 2015. Т. 51. № 2. С. 227–235. <https://doi.org/10.7868/S0016675815020149>
7. Бочарова А.В., Марусин А.В., Макеева О.А. и др. Генетические варианты, связанные с нарушениями когнитивных функций человека, при болезни Альцгеймера // *Мед. генетика.* 2018. Т. 17. № 1. С. 14–19. <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2018.01.14-19>
8. Бочарова А.В., Марусин А.В., Иванова С.А. и др. Генетические варианты генов *TCF4*, *LSM1* и *CCDC60* ассоциированы с шизофренией // *Мед. генетика.* 2020. Т. 19. № 4. С. 17–19. <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2020.04.17-19>
9. Bocharova A., Vagaitseva K., Marusin F. et al. Association and gene-gene interactions study of late-onset Alzheimer's disease in the russian population // *Genes.* 2021. V. 12. P. 1647. <https://doi.org/10.3390/genes12101647>
10. Бочарова А.В., Степанов В.А. Генетическое разнообразие популяций Северной Евразии по маркерам, ассоциированным с заболеваниями, нарушающими когнитивные функции человека // *Генетика.* 2021. Т. 57. № 9. С. 1062–1072. <https://doi.org/10.31857/S0016675821080026>
11. Бочарова А.В., Степанов В.А. Современные исследования генетики многофакторных заболеваний, связанных с нарушением когнитивных функций человека // *Сиб. журн. клинич. и эксперим. медицины.* 2021. № 4. P. 37–44. <https://doi.org/10.29001/2073-8552-2021-36-4-37-44>
12. Liao Y., Wang J., Jaehnig E.J. et al. WebGestalt 2019: Gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs // *Nucl. Acids. Res.* 2019. V. 47. № W1. P. W199–W205. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz401>
13. Szklarczyk D., Gable A.L., Lyon D. et al. STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets // *Nucl. Acids Res.* 2019. V. 47. № D1. P. D607–D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>
14. Ashburner M., Ball C.A., Blake J.A. et al. Gene ontology: Tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium // *Nat. Genet.* 2000. V. 25. № 1. P. 25–29. <https://doi.org/10.1038/75556>
15. Bliss T.V., Cooke S.F. Long-term potentiation and long-term depression: A clinical perspective // *Clinics (Sao Paulo).* 2011. V. 66. Suppl. 1. P. 3–17. <https://doi.org/10.1590/s1807-59322011001300002>
16. Alkadhi K.A. Neuroprotective effects of nicotine on hippocampal long-term potentiation in brain disorders // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2018. V. 366. № 3. P. 498–508. <https://doi.org/10.1124/jpet.118.247841>
17. Cleary J.P., Walsh D.M., Hofmeister J.J. et al. Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function // *Nat. Neurosci.* 2005. V. 8. № 1. P. 79–84. <https://doi.org/10.1038/nn1372>
18. Cullen W.K., Suh Y.H., Anwyl R., Rowan M.J. Block of LTP in rat hippocampus in vivo by beta-amyloid precursor protein fragments // *Neuroreport.* 1997. V. 8. № 15. P. 3213–3217. <https://doi.org/10.1097/00001756-199710200-00006>

19. <https://phgkb.cdc.gov/PHGKB/hNHome.action>
20. O'Donovan M.C., Craddock N., Norton N. et al. Identification of loci associated with schizophrenia by genome-wide association and follow-up // *Nat. Genet.* 2008. V. 40. № 9. P. 1053–1055. <https://doi.org/10.1038/ng.201>
21. Matthews J.M., Sunde M. Zinc fingers-folds for many occasions // *IUBMB Life.* 2002. V. 54. № 6. P. 351–355. <https://doi.org/10.1080/15216540216035>
22. Федотова А.А., Бончук А.Н., Могила В.А., Георгиев П.Г. Белки с цинковыми пальцами типа C2H2 – самый многочисленный и наименее изученный класс транскрипционных факторов высших эукариот // *Acta Naturae.* 2017. Т. 9. № 2. С. 50–61.
23. Deans P.J.M., Raval P., Sellers K.J. et al. Psychosis risk candidate ZNF804A localizes to synapses and regulates neurite formation and dendritic spine structure // *Biol. Psychiatry.* 2017. V. 82. № 1. P. 49–61. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.08.038>
24. Penzes P., Cahill M.E., Jones K.A. et al. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders // *Nat. Neurosci.* 2011. V. 14. № 3. P. 285–293. <https://doi.org/10.1038/nn.2741>
25. Chang H., Xiao X., Li M. The schizophrenia risk gene ZNF804A: Clinical associations, biological mechanisms and neuronal functions // *Mol. Psychiatry.* 2017. V. 22. № 7. P. 944–953. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.19>
26. Srivastava D.P., Woolfrey K.M., Penzes P. Analysis of dendritic spine morphology in cultured CNS neurons // *J. Vis. Exp.* 2011. V. 53. P. e2794. <https://doi.org/10.3791/2794>
27. Zhou D., Xiao X., Li M. The schizophrenia risk isoform ZNF804^{AE3E4} affects dendritic spine // *Schizophrenia Res.* 2020. V. 218. P. 324–325. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2019.12.038>
28. Tao R., Cousijn H., Jaffé A.E. et al. Expression of ZNF804A in human brain and alterations in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder: A novel transcript fetally regulated by the psychosis risk variant rs1344706 // *JAMA Psychiat.* 2014. V. 71. № 10. P. 1112–1120. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2014.1079>
29. Corder E.H., Saunders A.M., Strittmatter W.J. et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families // *Science.* 1993. V. 261. № 5123. P. 921–923. <https://doi.org/10.1126/science.8346443>
30. Strittmatter W.J., Weisgraber K.H., Huang D.Y. et al. Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: Isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. № 17. P. 8098–8102. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.17.8098>
31. Roses A.D. Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer's disease // *Annu. Rev. Med.* 1996. V. 47. P. 387–400. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.47.1.387>
32. Kecmanović M., Dobricić V., Dimitrijević R. et al. Schizophrenia and apolipoprotein E gene polymorphism in Serbian population // *Int. J. Neurosci.* 2010. V. 120. № 7. P. 502–506. <https://doi.org/10.3109/00207451003765956>
33. Gibbons A.S., Udawela M., Jeon W.J. et al. The neurobiology of APOE in schizophrenia and mood disorders // *Front Biosci. (Landmark Ed).* 2011. V. 16. P. 962–979. <https://doi.org/10.2741/3729>
34. Giau V.V., Bagyinszky E., An S.S., Kim S.Y. Role of apolipoprotein E in neurodegenerative diseases // *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2015. V. 11. P. 1723–1737. <https://doi.org/10.2147/NDT.S84266>
35. Yin Y., Wang Z. ApoE and neurodegenerative diseases in aging // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2018. V. 1086. P. 77–92. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1117-8_5
36. Xu M.Q., St Clair D., He L. Meta-analysis of association between ApoE epsilon4 allele and schizophrenia // *Schizophr. Res.* 2006. V. 84. № 2–3. P. 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2006.02.015>
37. Allen N.C., Bagade S., McQueen M.B. et al. Systematic meta-analyses and field synopsis of genetic association studies in schizophrenia: the SzGene database // *Nat. Genet.* 2008. V. 40. № 7. P. 827–834. <https://doi.org/10.1038/ng.171>
38. Lambert J.C., Ibrahim-Verbaas C.A., Harold D. et al. Meta-analysis of 74046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease // *Nat. Genet.* 2013. V. 45. № 12. P. 1452–1458. <https://doi.org/10.1038/ng.2802>
39. Abyadeh M., Djafarian K., Heydarinejad F. et al. Association between apolipoprotein E gene polymorphism and Alzheimer's disease in an Iranian population: A Meta-Analysis // *J. Mol. Neurosci.* 2019. V. 69. № 4. P. 557–562. <https://doi.org/10.1007/s12031-019-01381-1>
40. Ishii K., Kubo K., Nakajima K. Reelin and neuropsychiatric disorders // *Front. Cell Neurosci.* 2016. V. 10. P. 229. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00229>
41. Ovidia G., Shifman S. The genetic variation of RELN expression in schizophrenia and bipolar disorder // *PLoS One.* 2011. V. 6. P. e19955. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019955>
42. Bufill E., Roura-Poch P., Sala-Matavera I. et al. Reelin signaling pathway genotypes and Alzheimer disease in a Spanish population // *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 2015. V. 29. № 2. P. 169–172. <https://doi.org/10.1097/WAD.0000000000000002>
43. Saez-Valero J., Costell M., Sjogren M. et al. Altered levels of cerebrospinal fluid reelin in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease // *J. Neurosci. Res.* 2003. V. 72. № 1. P. 132–136. <https://doi.org/10.1002/jnr.10554>
44. Seripa D., Matera M.G., Franceschi M. et al. The RELN locus in Alzheimer's disease // *J. Alzheimers. Dis.* 2008. V. 14. № 3. P. 335–344. <https://doi.org/10.3233/jad-2008-14308>
45. Botella-López A., Cuchillo-Ibáñez I., Cotrufo T. et al. Beta-amyloid controls altered Reelin expression and processing in Alzheimer's disease // *Neurobiol. Dis.* 2010. V. 37. № 3. P. 682–691. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.12.006>
46. Pujadas L., Rossi D., Andrés R. et al. Reelin delays amyloid-beta fibril formation and rescues cognitive deficits in a model of Alzheimer's disease // *Nat. Commun.*

2014. V. 5. P. 3443.
<https://doi.org/10.1038/ncomms4443>
47. Rossi D., Gruart A., Contreras-Murillo G. et al. Reelin reverts biochemical, physiological and cognitive alterations in mouse models of Tauopathy // *Prog. Neurobiol.* 2020. V. 186. P. 101743.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2019.101743>
48. Roth T.L., Lubin F.D., Sodhi M., Kleinman J.E. Epigenetic mechanisms in schizophrenia // *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. V. 1790. P. 869–877.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.06.009>
49. Veldic M., Guidotti A., Maloku E. et al. In psychosis, cortical interneurons overexpress DNA-methyltransferase 1 // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. № 6. P. 2152–2157.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0409665102>
50. Impagnatiello F., Caruncho H., Niu S. et al. Reelin promotes hippocampal dendrite development through the VLDLR/ApoER2-Dab1 pathway // *Neuron.* 2004. V. 41. P. 71–84.
[https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00819-5](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00819-5)
51. Glantz L.A., Lewis D.A. Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical pyramidal neurons in schizophrenia // *Arch. Gen. Psychiatry.* 2000. V. 57. P. 65–73.
<https://doi.org/10.1001/archpsyc.57.1.65>

Gene–Gene Interactions and Biological Network Analysis of Diseases with Disturbances of Human Cognitive Functions

A. V. Bocharova^a, * and V. A. Stepanov^a

^aResearch Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634050 Russia

*e-mail: anna.bocharova@medgenetics.ru

Neurological and mental diseases, such as schizophrenia, Alzheimer's disease, bipolar disorder, Parkinson's disease, have complex phenotypes with cognitive impairment. These diseases are socially significant pathologies and serious problems for world health and are distinguished by the multilevel nature of the implementation of genetic information. A number of active genes are involved in the formation of the final phenotype. Thereby, it is necessary to apply the analysis of biological networks aimed at identifying the interacting genes and proteins that lead to the pathogenesis of the disease, in order to understand the molecular mechanisms underlying the studied pathology. In this study, various online resources and databases were used to implement this approach: WebGestalt, Gene Ontology, STRING. The protein-protein interaction network was obtained, where two subnets are distinguished, one of which is involved in the risk of developing schizophrenia, and the other in the risk of developing Alzheimer's disease.

Keywords: cognitive functions, cognitive impairment, schizophrenia, Alzheimer's disease, biological networks.

АССОЦИИИ ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ ГЕНОВ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ С РАЗВИТИЕМ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ЖЕНЩИН ЦЕНТРАЛЬНО-ЧЕРНОЗЕМНОГО РЕГИОНА РОССИИ

© 2023 г. Н. В. Павлова¹, И. В. Пономаренко¹, В. С. Орлова¹,
И. В. Батлуцкая¹, О. А. Ефремова¹, М. И. Чурносков^{1, *}¹Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, 308015 Россия

*e-mail: churnosov@bsu.edu.ru

Поступила в редакцию 09.04.2022 г.

После доработки 19.05.2022 г.

Принята к публикации 23.06.2022 г.

Изучена ассоциация полиморфных вариантов генов матриксных металлопротеиназ (*MMP*) с раком молочной железы (РМЖ) у женщин Центрально-Черноземного региона (ЦЧР) России с учетом наличия/отсутствия отягощенного семейного анамнеза. В исследование включены 358 больных РМЖ (у 68 пациенток зарегистрирован отягощенный семейный анамнез) и 746 женщин контрольной группы. Выполнено генотипирование 10 полиморфных локусов генов *MMP* (rs1799750 *MMP1*; rs243865 *MMP2*; rs679620 *MMP3*; rs1940475 *MMP8*; rs17576, rs17577, rs3918242, rs2250889, rs3787268, rs3918249 *MMP9*). Для изучения ассоциаций полиморфных вариантов *MMP*-генов с РМЖ в двух подгруппах с учетом наличия/отсутствия отягощенного семейного анамнеза (контрольная группа для этих двух подгрупп была одинаковой) использовался метод логистического регрессионного анализа. Выявлено, что низкий риск развития заболевания среди женщин с отягощенным семейным анамнезом ассоциирован с полиморфными локусами rs243865 *MMP2* (ОШ = 0.53–0.54, $p_{\text{perm}} \leq 0.03$) и rs2250889 *MMP9* (ОШ = 0.36–0.37, $p_{\text{perm}} \leq 0.04$). У женщин без отягощенной наследственности повышенный риск развития РМЖ ассоциирован с rs3787268 *MMP9* (ОШ = 2.16, $p_{\text{perm}} = 0.03$) и гаплотипами полиморфных локусов гена *MMP9* ($p_{\text{perm}} \leq 0.05$): СА rs3918249–rs17576 (ОШ = 2.15), ССА rs3918242–rs3918249–rs17576 (ОШ = 1.69), ССАG rs3918242–rs3918249–rs17576–rs3787268 (ОШ = 1.69), САGCG rs3918249–rs17576–rs3787268–rs2250889–rs17577 (ОШ = 3.06). Три гаплотипа ассоциированы с низким риском возникновения РМЖ у женщин без отягощенной наследственности: GG rs17576–rs3787268 (ОШ = 0.60), GGC rs17576–rs3787268–rs2250889 (ОШ = 0.63) и CGG rs3918249–rs17576–rs3787268 (ОШ = 0.62).

Ключевые слова: рак молочной железы, гены матриксных металлопротеиназ, полиморфные локусы, ассоциации, наследственная отягощенность.

DOI: 10.31857/S001667582302008X, **EDN:** KYAYIZ

Рак молочной железы (РМЖ) является злокачественной опухолью, которая формируется из эпителиальных структур молочной железы [1]. Согласно данным Международного агентства по изучению рака, опубликованным в 2020 г., РМЖ является наиболее часто диагностируемым раком у женщин – на его долю приходится 24.5% в структуре злокачественных заболеваний и ежегодно в мире регистрируется 2.3 миллиона новых случаев болезни [2]. В структуре смертности женского населения в мире в целом удельный вес РМЖ составляет 15.5% (ежегодно данная патология является причиной смерти 685 тыс. женщин) [3]. Согласно материалам официальной статистики, представленным Росстатом РФ [4], в России за последние 15 лет наблюдается существенный рост (на 49%) количества пациентов с установленным впервые

в жизни диагнозом РМЖ – с 49.5 тыс. человек в 2005 г. до и 73.9 тыс. человек в 2019 г. Следует отметить, что РМЖ является ведущим онкологическим заболеванием у женского населения РФ – он занимает первое место как в структуре онкозаболеваемости женщин (20.9%), так и в структуре причин смерти женщин от злокачественных новообразований (16.18%) [5]. При этом важно подчеркнуть, что среди изучаемого в настоящей работе населения ЦЧР России (входит в состав Центрального федерального округа (ЦФО) РФ) показатели заболеваемости РМЖ превышают данные по РФ в целом [5]. Так, в 2018 г. в ЦФО РФ заболеваемость РМЖ среди женщин составила 53.04 на 100 тыс. женского населения (в том числе в областях ЦЧР РФ: Белгородская – 52.77, Курская –

53.64, Воронежская — 51.78), тогда как в РФ в целом этот показатель составил 51.64 [5].

Генетические факторы имеют важное значение в формировании РМЖ: считается, что порядка 30% всех случаев заболевания имеют наследственный характер [6]. Однако конкретные генетические факторы, определяющие развитие РМЖ, остаются в значительной степени неизвестными [6, 7]. Установленные к настоящему времени мутации в генах предрасположенности к РМЖ с высокой и умеренной пенетрантностью (*BRCA1/2*, *CHEK2*, *PALB2*, *ATM* и др.) [6–8] определяют около 5% случаев заболевания и они выявляются лишь у 1/3 больных (30–40%), имеющихотягощенный семейный анамнез [6, 7]. Проведенные многочисленные полногеномные исследования (GWAS) позволили определить около 200 полиморфных локусов, ассоциированных с РМЖ [9], которые определяют порядка 18% его наследуемости [10]. Следует отметить, что показатель наследуемости РМЖ, полученный по GWAS-данным (18%), более чем в 1.7 раза меньше аналогичного показателя, полученного по данным близнецовых исследований (31%) [11].

Одной из “перспективных” для исследования групп генов-кандидатов РМЖ являются гены матриксных металлопротеиназ (*MMP*), белковые продукты которых — матриксные металлопротеиназы имеют большое значение в патофизиологии заболевания [12, 13]. *MMP* являются цинк-зависимыми эндопептидазами, они продуцируются опухолевыми и стромальными клетками, “активно” участвуют в процессах деградациии экстрацеллюлярного матрикса и базальной мембраны, влияя тем самым на рост опухоли, ангиогенез, метастазирование [12, 13]. Показана значительно более высокая продукция *MMP* (*MMP2*, *MMP9* и др.) в опухолевых клетках при РМЖ в сравнении с “нормальными” клетками молочной железы [14, 15].

В литературе представлено достаточно большое количество генетико-эпидемиологических исследований (более 50), посвященных изучению ассоциаций полиморфных локусов генов *MMP* с РМЖ в различных этно-территориальных группах [15–25 и др.]. Однако несмотря на это, полученные в результате проведенных исследований результаты нередко неоднозначны, а для отдельных полиморфных локусов — противоречивы. Так, например, ассоциация локуса rs243865 гена *MMP2* с РМЖ изучена в 17 экспериментальных исследованиях и трех метаанализах, среди которых лишь в восьми работах продемонстрированы “рисковое” значение для заболевания его аллеля *C* или протективная роль аллеля *T*, тогда как в значительном количестве этих исследований локус rs243865 гена *MMP2* не ассоциирован с РМЖ [16–20 и др.]. Еще более противоречивая информация по ассоциации с РМЖ получена для локуса rs3787268 *MMP9*: в ряде исследований фактором риска для

развития болезни является аллель *A* этого локуса [21], по результатам других работ данный полиморфизм не ассоциирован с заболеванием [22, 23] или, наоборот, аллель *A* ассоциирован с низким риском развития РМЖ [24, 25]. Вышеуказанные данные диктуют необходимость продолжения исследований по этой теме с целью установления “значимых” для РМЖ полиморфных локусов генов *MMP* в отдельных популяциях и в том числе Российской Федерации.

Цель настоящей работы — изучить ассоциации полиморфных вариантов генов *MMP* с РМЖ у женщин Центрально-Черноземного региона России с учетом наличия/отсутствия отягощенного семейного анамнеза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 358 больных РМЖ (у 68 пациенток зарегистрирован отягощенный семейный анамнез (родственники 1–2 степени родства имели РМЖ (карциному молочной железы)) и 290 пациенток не имели наследственной отягощенности по РМЖ) и 746 женщин контрольной группы без отягощенного семейного анамнеза по РМЖ. Все женщины, включенные в исследование, — русские, родились и проживали в ЦЧР России [26, 27]. Выборка больных РМЖ была сформирована на базе Белгородского областного онкологического диспансера за период 2010–2016 гг. и в нее включали пациенток с впервые выявленными карциномами молочной железы. Диагноз заболевания был подтвержден с помощью патоморфологического исследования образцов опухолевой ткани, полученных интраоперационно [1]. Контрольная группа была сформирована в результате профосмотров, проводимых на базе перинатального центра БОКБ, из женщин аналогичного возраста, не имеющих клинических, клинико-инструментальных и анамнестических признаков РМЖ. Средний возраст больных составил 54.7 ± 12.7 лет (варьировал от 25 до 84 лет), контрольной группы — 55.3 ± 11.2 лет (варьировал от 27 до 82 лет) ($p > 0.05$).

Для генетического исследования использовали образцы ДНК обследуемых (ДНК выделяли из венозной крови). Отбор полиморфных локусов генов *MMP* для настоящего исследования проводили на основе следующих критериев: 1) данные для сравнительного анализа представлены в литературных источниках [15–25 и др.]; 2) значимый регуляторный потенциал (расположение в функционально активных участках генома (энхансеры, промоторы), локализация в регионах связывания с белками-регуляторами и факторами транскрипции и др.). Регуляторный потенциал SNP оценивали *in silico* с помощью биоинформатической базы HaploReg [28] согласно ранее представленной методике [29]. Всего в работе исследовано 10 локусов пяти генов *MMP*: *MMP1*

(rs1799750), *MMP2* (rs243865), *MMP3* (rs679620), *MMP8* (rs1940475), *MMP9* (rs17576, rs17577, rs3918242, rs2250889, rs3787268, rs3918249). Генотипирование полиморфных локусов проводили на амплификаторе CFX96 (фирма-производитель — “Bio-Rad”, США) [30] (использовался метод TaqMan зондов и технология real-time ПЦР; применялись наборы реагентов, разработанные фирмой “Тест-Ген”, Россия). С целью контроля качества генотипирования в работе проводили “слепое” ре-генотипирование около 5% анализируемых образцов ДНК [31], которое показало 100%-ную воспроизводимость результатов.

Для оценки ассоциаций полиморфных вариантов генов *MMP* с РМЖ использовали программу PLINK [32] и общепринятый метод логистической регрессии с проведением расчетов показателей отношения шансов (ОШ) и их 95%-ного доверительного интервала (95%ДИ) [33] в аллельной, доминантной, рецессивной, аддитивной генетико-статистических моделях. С целью коррекции на множественные сравнения (ложноположительные ассоциации) применяли адаптивный пермутационный тест [34] с требуемым уровнем статистической значимости ($p_{\text{perm}} < 0.05$). Локусы *MMP*, показавшие значимые ассоциации с заболеванием, детально проанализированы *in silico* с помощью биоинформатической базы NARloReg [28] и имеющихся литературных данных по этому вопросу на предмет их функциональной значимости [35–37].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено соответствие наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому при выполнении равновесия Харди–Вайнберга среди изучаемых групп больных РМЖ (с отягощенным семейным анамнезом и без наследственной отягощенности) и контроля по всем рассматриваемым полиморфным локусам генов *MMP* (при уровне статической значимости с учетом поправки Бонферрони на множественные сравнения согласно числу анализируемых SNP-вариантов ($n = 10$) $p_{\text{bonferroni}} > 0.005$ (0.05/10)) (табл. 1).

В результате проведенного анализа обнаружены различия в наборе полиморфных локусов генов-кандидатов *MMP*, ассоциированных с РМЖ, у женщин, имеющих и не имеющих отягощенный семейный анамнез. Данные, представленные в табл. 2, свидетельствуют о том, что у женщин с отягощенным семейным анамнезом по развитию РМЖ ассоциированы локус rs243865 (C>T) гена *MMP2* согласно аллельной (T против C, ОШ = 0.54, 95%ДИ 0.33–0.88, $p_{\text{perm}} = 0.01$), аддитивной (TT против CT против CC, ОШ = 0.54, 95%ДИ 0.34–0.90, $p_{\text{perm}} = 0.01$) и доминантной (TT и CT против CC, ОШ = 0.53, 95%ДИ 0.30–0.92, $p_{\text{perm}} = 0.03$) ге-

нетико-статистическим моделям и локус rs2250889 (C>G) гена *MMP9* в соответствии с аддитивной (GG против CG против CC, ОШ = 0.37, 95%ДИ 0.15–0.94, $p_{\text{perm}} = 0.04$) и доминантной (GG и CG против CC, ОШ = 0.36, 95%ДИ 0.14–0.96, $p_{\text{perm}} = 0.04$) генетико-статистическими моделями. РМЖ без отягощенной наследственности ассоциирован с локусом rs3787268 (G>A) гена *MMP9* в рамках рецессивной генетико-статистической модели (AA против GA и GG, ОШ = 2.16, 95%ДИ 1.08–4.32, $p_{\text{perm}} = 0.04$).

При анализе гаплотипов по шести полиморфным локусам гена *MMP9*, расположенным рядом друг с другом (на дистанции ≈ 7 тыс. пн) на хромосоме 20, обнаружены ассоциации спорадического РМЖ с семью гаплотипами, включающими все шесть рассмотренных в настоящей работе полиморфных локусов гена *MMP9*. Причем большинство (четыре из семи) этих гаплотипов “повышают” риск развития заболевания: CA rs3918249–rs17576 (ОШ = 2.15, $p = 0.009$), CCA rs3918242–rs3918249–rs17576 (ОШ = 1.69, $p = 0.004$), CCAG rs3918242–rs3918249–rs17576–rs3787268 (ОШ = 1.69, $p = 0.005$), CAGCG rs3918249–rs17576–rs3787268–rs2250889–rs17577 (ОШ = 3.06, $p = 0.009$). Три гаплотипа ассоциированы с низким риском возникновения РМЖ: GG rs17576–rs3787268 (ОШ = 0.60, $p = 0.005$), GGC rs17576–rs3787268–rs2250889 (ОШ = 0.63, $p = 0.01$), и CGG rs3918249–rs17576–rs3787268 (ОШ = 0.62, $p = 0.01$). Следует отметить, что показатель p_{perm} для всех семи вышеуказанных гаплотипов соответствует уровню статистической значимости $p_{\text{perm}} < 0.05$. Нами не зарегистрированы статистически подтвержденные ассоциации гаплотипов по исследованным SNP гена *MMP9* с риском развития РМЖ у женщин с отягощенным семейным анамнезом ($p_{\text{perm}} > 0.05$).

Итак, согласно полученным нами данным у женщин Центрально-Черноземного региона РФ с отягощенным семейным анамнезом по РМЖ “протективное” значение для развития заболевания имеют аллели T rs243865 (C>T) *MMP2* (ОШ = 0.53–0.54) и G rs2250889 (C>G) *MMP9* (ОШ = 0.36–0.37, $p_{\text{perm}} \leq 0.04$), а у женщин без отягощенной наследственности повышенный риск возникновения заболевания маркируется генотипом AA rs3787268 (G>A) *MMP9* (ОШ = 2.16), а также различными гаплотипами гена *MMP9*, включающими разные сочетания аллелей шести изученных полиморфных локусов данного гена (rs3918242; rs3918249; rs17576; rs3787268; rs2250889; rs17577).

Сравнительный анализ полученных нами результатов и данных литературы показывает следующее. Ассоциация полиморфизма rs243865 (C>T) *MMP2* с РМЖ активно изучается различными исследовательскими группами в разных этно-территориальных популяциях мира — в литературе имеются результаты 20 исследований, посвящен-

Таблица 1. Данные о распределении аллелей и генотипов полиморфных локусов генов *MMP* в изучаемых группах больных РМЖ и контроле

Полиморфизм гена	Генотипы, редкий аллель	Больные РМЖ		Контрольная группа ($N = 746$), % (n)
		отягощенный семейный анамнез ($N = 68$), % (n)	без отягощенного семейного анамнеза ($N = 290$), % (n)	
rs1799750 <i>MMP1</i>	<i>1G1G</i>	28.36 (19)	27.53 (79)	30.43 (220)
	<i>1G2G</i>	49.25 (33)	51.22 (147)	46.33 (335)
	<i>2G2G</i>	22.39 (15)	21.25 (61)	23.24 (168)
	<i>2G</i>	47.01	46.86	46.40
	p_{HWE}	1.00	0.72	0.07
rs243865 <i>MMP2</i>	<i>CC</i>	71.21 (47)	54.58 (155)	57.24 (419)
	<i>CT</i>	27.27 (18)	39.79 (113)	35.66 (261)
	<i>TT</i>	1.52 (1)	5.63 (16)	7.10 (52)
	<i>T</i>	15.15	25.53	24.93
	p_{HWE}	1.00	0.53	0.20
rs679620 <i>MMP3</i>	<i>CC</i>	22.73 (15)	27.93 (81)	25.71 (190)
	<i>CT</i>	60.61 (40)	49.31 (143)	48.85 (361)
	<i>TT</i>	16.66 (11)	22.76 (66)	25.44 (188)
	<i>T</i>	46.97	47.41	49.86
	p_{HWE}	0.14	0.90	0.55
rs1940475 <i>MMP8</i>	<i>CC</i>	22.06 (15)	25.78 (74)	28.34 (210)
	<i>CT</i>	51.47 (35)	54.01 (155)	45.48 (337)
	<i>TT</i>	26.47 (18)	20.21 (58)	26.18 (194)
	<i>T</i>	52.21	47.21	48.92
	p_{HWE}	1.00	0.19	0.02
rs3918242 <i>MMP9</i>	<i>CC</i>	66.18 (45)	71.33 (204)	69.12 (508)
	<i>CT</i>	30.88 (21)	24.13 (69)	28.43 (209)
	<i>TT</i>	2.94 (2)	4.54 (13)	2.45 (18)
	<i>T</i>	18.38	16.61	16.67
	p_{HWE}	1.00	0.03	0.60
rs3918249 <i>MMP9</i>	<i>TT</i>	43.28 (29)	42.71 (120)	37.55 (276)
	<i>TC</i>	47.76 (32)	41.28 (116)	47.07 (346)
	<i>CC</i>	8.96 (6)	16.01 (45)	15.38 (113)
	<i>C</i>	32.84	36.65	38.91
	p_{HWE}	0.59	0.07	0.82
rs17576 <i>MMP9</i>	<i>AA</i>	44.12 (30)	45.07 (128)	38.22 (284)
	<i>AG</i>	47.06 (32)	40.49 (115)	45.76 (340)
	<i>GG</i>	8.82 (6)	14.44 (41)	16.01 (119)
	<i>G</i>	32.35	34.68	38.90
	p_{HWE}	0.78	0.09	0.32

Таблица 1. Окончание

Полиморфизм гена	Генотипы, редкий аллель	Больные РМЖ		Контрольная группа (N = 746), % (n)
		отягощенный семейный анамнез (N = 68), % (n)	без отягощенного семейного анамнеза (N = 290), % (n)	
rs3787268 <i>MMP9</i>	GG	63.08 (41)	59.30 (169)	61.03 (451)
	GA	33.85 (22)	33.33 (95)	34.91 (258)
	AA	3.07 (2)	3.37 (21)	4.06 (30)
	A	20.00	24.04	21.52
	<i>p</i> _{HWE}	1.00	0.14	0.39
rs2250889 <i>MMP9</i>	CC	86.57 (58)	84.72 (244)	80.14 (589)
	CG	13.43 (9)	13.89 (40)	17.82 (131)
	GG	0.00 (0)	1.39 (4)	2.04 (15)
	G	6.72	8.33	10.95
	<i>p</i> _{HWE}	1.00	0.12	0.02
rs17577 <i>MMP9</i>	GG	62.79 (42)	72.73 (208)	68.73 (499)
	AG	34.33 (23)	23.08 (66)	28.51 (207)
	AA	2.98 (2)	4.19 (12)	2.76 (20)
	A	20.15	15.73	17.01
	<i>p</i> _{HWE}	1.00	0.04	0.89

ных этому вопросу, которые были выполнены за период 2004–2022 гг. Следует отметить, что полученные при этом результаты в разных популяциях неоднозначны. В ряде работ показана ассоциация локуса rs243865 (C>T) гена *MMP2* с РМЖ и отдельными его клиническими проявлениями (наличие метастазов, выживаемость, гистологический тип опухоли и др.) как самостоятельно, так и в составе комбинаций с другими полиморфными локусами генов матриксных металлопротеиназ [17, 20, 38–42]. При этом в этих исследованиях, как и в нашей работе (для группы женщин с отягощенной наследственностью), протективную роль для развития РМЖ имеет аллель T локуса rs243865, а соответственно рискованное значение для возникновения заболевания имеет аллельный вариант C локуса rs243865. Так, в исследованиях, проведенных в Мексике (изучались выборки из 90 больных и 96 контроля) [20] и Саудовской Аравии (работа проведена на выборках, включающих 90 пациентов с РМЖ и 92 контроля) [39], генетическим фактором повышенного риска развития рассматриваемого заболевания является генотип CC (ОШ = 2.15 и ОШ = 2.02 соответственно). В метаанализе обнаружено, что больные РМЖ имеют более высокую частоту генотипа CC (OR = 1.27) и более низкую частоту генотипа CT (OR = 0.78) rs243865 (C>T) *MMP2* в сравнении с контролем [17]. В результате

другого метаанализа (включал 9858 больных РМЖ и 10871 контроля), показано, что генотип CC rs243865 связан с повышенным риском развития РМЖ только в популяции Латинской Америки, но не в Европе и Азии [40]. В работах, выполненных в Китае (анализировались 462 больных РМЖ и 509 контроля) [38] и Тунисе (изучено 210 больных РМЖ и 250 контроля) [41], было показано, что аллель T имеет протективное значение для РМЖ (ОШ = 0.46 и ОШ = 0.49 соответственно).

Наряду с этим в ряде исследований, проведенных в различных популяциях (польской, греческой, бразильской, шведской, китайской, иранской и др.), ассоциаций полиморфизма rs243865 (C>T) гена *MMP2* с РМЖ не выявлено ($p > 0.05$) [19, 21, 43–49]. Не установлено ассоциации локуса rs243865 (C>T) гена *MMP2* с РМЖ и в исследовании у российских женщин (выборка включала 395 больных инфильтрирующим РМЖ и 329 контроля) [50]. При этом следует отметить, что авторы работы зарегистрировали отклонение от равновесия Харди–Вайнберга в исследуемой выборке больных ($p = 0.0089$), что по их мнению вероятно свидетельствует о воздействии какого-либо фактора, связанного с развитием неопластического процесса в этой группе женщин. Также не выявлено ассоциации локуса rs243865 (C>T) гена *MMP2* с РМЖ и метастазами при РМЖ и в двух

Таблица 2. Показатели ассоциации полиморфизма генов *MMP* с раком молочной железы с учетом наличия/отсутствия отягощенного семейного анамнеза

Полиморфизм гена	Редкий аллель	N	Аллельная модель				Аддитивная модель				Доминантная модель				Рецессивная модель			
			ОШ	95%ДИ		p	ОШ	95%ДИ		p	ОШ	95%ДИ		p	ОШ	95%ДИ		p
				L95	U95			L95	U95			L95	U95			L95	U95	
В группе больных с отягощенным семейным анамнезом																		
rs1799750 MMP1	2G	790	1.03	0.72	1.46	0.89	0.96	0.65	1.42	0.85	0.95	0.51	1.76	0.87	0.95	0.47	1.89	0.88
rs243865 MMP2	T	798	0.54	0.33	0.88	0.01	0.54	0.34	0.90	0.01	0.53	0.30	0.92	0.03	0.27	0.04	2.03	0.20
rs679620 MMP3	T	805	0.89	0.62	1.27	0.52	0.86	0.57	1.30	0.47	1.06	0.53	2.10	0.87	0.60	0.28	1.28	0.18
rs1940475 MMP8	T	809	1.14	0.80	1.62	0.46	1.15	0.77	1.72	0.49	1.16	0.60	2.24	0.67	1.27	0.67	2.40	0.47
rs3918242 MMP9	T	803	1.13	0.71	1.78	0.61	1.05	0.62	1.77	0.86	1.04	0.56	1.92	0.90	1.17	0.25	5.44	0.84
rs3918249 MMP9	C	802	0.77	0.53	1.12	0.17	0.82	0.54	1.25	0.36	0.80	0.45	1.43	0.45	0.71	0.29	1.73	0.45
rs17576 MMP9	G	811	0.75	0.52	1.09	0.13	0.80	0.52	1.22	0.30	0.76	0.42	1.35	0.34	0.73	0.30	1.76	0.48
rs3787268 MMP9	A	804	0.91	0.58	1.43	0.69	1.03	0.61	1.73	0.92	1.01	0.55	1.85	0.98	1.20	0.27	5.33	0.81
rs2250889 MMP9	G	802	0.59	0.29	1.17	0.13	0.37	0.15	0.94	0.04	0.36	0.14	0.96	0.04	0.00	0.00	—	1.00
rs17577 MMP9	A	793	1.23	0.79	1.92	0.36	1.19	0.72	1.98	0.50	1.26	0.69	2.30	0.46	1.10	0.24	5.00	0.91
В группе больных без отягощенной наследственности																		
rs1799750 MMP1	2G	1002	1.02	0.84	1.24	0.85	1.12	0.88	1.41	0.36	1.40	0.95	2.07	0.09	0.94	0.62	1.41	0.76
rs243865 MMP2	T	1005	1.03	0.83	1.29	0.78	0.93	0.70	1.22	0.59	1.01	0.72	1.43	0.94	0.53	0.23	1.21	0.13
rs679620 MMP3	T	1018	0.91	0.75	1.10	0.32	0.86	0.67	1.09	0.20	0.80	0.55	1.17	0.25	0.83	0.56	1.23	0.35
rs1940475 MMP8	T	1017	0.93	0.77	1.13	0.49	1.01	0.80	1.27	0.94	0.91	0.63	1.32	0.63	1.13	0.77	1.66	0.52
rs3918242 MMP9	T	1010	1.00	0.77	1.29	0.97	1.03	0.75	1.41	0.86	0.99	0.69	1.43	0.97	1.37	0.54	3.48	0.50
rs3918249 MMP9	C	1005	0.91	0.74	1.11	0.35	0.97	0.76	1.23	0.80	0.91	0.64	1.29	0.60	1.05	0.66	1.66	0.84
rs17576 MMP9	G	1016	0.83	0.68	1.02	0.08	0.81	0.63	1.04	0.09	0.80	0.57	1.12	0.19	0.68	0.41	1.13	0.13
rs3787268 MMP9	A	1013	1.15	0.92	1.45	0.22	1.17	0.88	1.56	0.27	1.06	0.76	1.50	0.72	2.16	1.08	4.32	0.03
rs2250889 MMP9	G	1012	0.74	0.53	1.04	0.08	0.71	0.47	1.06	0.09	0.65	0.41	1.04	0.07	0.79	0.22	2.84	0.71
rs17577 MMP9	A	1001	0.91	0.70	1.19	0.49	0.90	0.65	1.24	0.50	0.88	0.60	1.27	0.48	0.90	0.34	2.37	0.83

Примечание. ОШ — отношение шансов, 95%ДИ — доверительный интервал отношения шансов (L95 — нижний предел и U95 — верхний предел доверительного интервала), p — уровень значимости, жирным выделены статистически значимые показатели с учетом результатов проведенного пермутационного теста (выполнено 1000 пермутаций).

метаанализах [16, 18]. Следует отметить, что в исследуемой нами группе женщин без отягощенной наследственности полиморфный локус rs243865 (C>T) гена *MMP2* также не был ассоциирован с РМЖ ($p > 0.05$). Полученные нами данные и имеющиеся литературные материалы позволяют предположить, что одним из факторов, который может объяснять неоднозначность результатов ассоциативных исследований локуса rs243865 (C>T) гена *MMP2* с РМЖ в разных популяциях, наряду с такими факторами как различия в генетической структуре рассматриваемых популяций человека, средовых и индивидуальных факторах риска заболевания, может быть различный удельный вес среди изучаемых больных РМЖ индивидуумов с отягощенным семейным анамнезом. Согласно результату настоящей работы у женщин с наследственной отягощенностью по РМЖ полиморфный локус rs243865 (C>T) гена *MMP2* определяет предрасположенность к развитию заболевания, тогда как у женщин без отягощенной наследственности данный локус не связан с риском развития РМЖ.

Согласно результату ранее проведенных экспериментальных исследований полиморфный локус rs243865 гена *MMP2* расположен в промоторном участке (CCACC box) данного гена (–1306C>T) в регионе сайта связывания фактора транскрипции SP-1, при этом нуклеотидная замена C>T приводит к снижению экспрессии белка MMP2 [51]. Данные исследований, посвященных *in silico* оценке функционального потенциала локуса rs243865 гена *MMP2*, указывают на его важную регуляторную роль в геноме человека: регион генома, в котором расположен данный полиморфизм, является мишенью для эпигенетической регуляции экспрессии генов посредством посттрансляционных модификаций гистоновых белков, связан с экспрессией гена *AYTL1* и длинной некодирующей РНК – *RP11-212121.2 (MMP2-AS1)*, является областью “открытого” хроматина (регион гиперчувствительности к ДНКазе) и др. [52, 53]. Согласно базе данных по эпигенетике HaploReg полиморфный вариант rs243865 находится в регионе генома, который является энхансерным регуляторным участком для этого гена (маркируется метилированным вариантом гистоновых белков фракции H3 – H3K4me1) в первичных миоэпителиальных клетках молочной железы (breast myoepithelial primary cells (Epigenome ID: E028, Mnemonic: BRST.MYO)).

Матриксная металлопротеиназа 2 (синоним: желатиназа А) обладает коллагенолитической активностью по отношению к коллагену IV типа и экспрессируется в клетках соединительной ткани [54]. Коллаген IV типа является составной частью базальных мембран и вследствие этого протеолитическая активность матриксной металлопротеиназы 2 приводит в конечном итоге к усилению remodelирования внеклеточного матрикса в мем-

бранных структурах [19]. Литературные данные показывают, что MMP-2 является одним из важнейших факторов, определяющих инвазию и метастазирование опухоли, при этом в очаге поражения РМЖ регистрируется существенно более высокая экспрессия MMP-2 в сравнении с “нормальными” клетками молочной железы, где она минимальна [14]. Важно подчеркнуть, что согласно нашему результату и ряду литературных данных [17, 20, 38–41] аллель T rs243865 имеет протективное значение при РМЖ (ОШ < 1) и нуклеотидная замена C>T (rs243865) в регионе сайта связывания фактора транскрипции SP-1 приводит к снижению экспрессии белка MMP2 [51], что полностью согласуется с вышеприведенными данными о минимально низкой экспрессии MMP-2 в “неопухолевых” клетках (фибробласты и др.) молочной железы при сравнении с опухолевыми клетками [14].

Наряду с полиморфным вариантом rs243865 (C>T) гена *MMP2* значимый вклад в предрасположенность к РМЖ среди женщин Центрально-Черноземного района России, имеющих отягощенный семейный анамнез по данной патологии, вносит полиморфизм rs2250889 (C>G) гена *MMP9*, аллель G которого является протективным фактором для рассматриваемого заболевания (ОШ < 1). Данные литературы по вопросу роли rs2250889 *MMP9* в формировании РМЖ весьма малочисленны и фрагментарны. Так, на настоящий момент в литературе представлены результаты лишь четырех экспериментальных исследований по этой теме, из которых два проведены в китайской популяции (одно исследование включало 1056 больных и 1063 контроля [55], другое исследование выполнено на выборке 249 больных и 255 контроля [56]) и по одному исследованию в малайзийской (выборки для исследования составили по 80 человек среди больных и контроля) [57] и иорданской (в работе анализировались 230 больных и 225 контроля) [58] популяциях. Значимая ассоциация локуса rs2250889 (C>G) гена *MMP9* с РМЖ из этих четырех работ установлена лишь в одном малочисленном исследовании, проведенном среди населения Малайзии: генетическим фактором повышенного риска развития заболевания (OR = 10.84) является генотип GG [57]. Из трех проведенных метаанализов по этому вопросу [22–24] в одном исследовании (основывалось на результатах трех из четырех вышеуказанных работ) показана ассоциация локуса rs2250889 (C>G) гена *MMP9* с РМЖ (рисковое значение для заболевания имеет аллель G, OR = 2.53) [23], а в двух работах (одна из них основывалось на результатах тех же трех из четырех вышеуказанных работ, как и предыдущий метаанализ, а другая включала две работы) такой ассоциации на статистически достоверном уровне выявлено не было ($p > 0.05$) ([24] и [22] соответственно).

Итак, согласно имеющимся литературным данным и полученным нами результатам можно констатировать, что из пяти проведенных исследований по изучению ассоциации rs2250889 (C>G) *MMP9* с РМЖ лишь в двух работах (одна из них наше исследование) показана ассоциация с заболеванием данного локуса. При этом генетическим фактором повышенного риска для азиатской популяции (население Малайзии) является генотип *GG* по локусу rs2250889 (C>G) гена *MMP9*, тогда как для европейской популяции (население Центрально-Черноземного района России с отягощенным семейным анамнезом по РМЖ) аллель *G* rs2250889 (C>G) гена *MMP9* имеет протективный эффект по отношению к рассматриваемому заболеванию (ОШ = 0.36–0.37). Безусловно, этих экспериментальных данных недостаточно, чтобы делать не только окончательные, но и промежуточные выводы о межэтнических особенностях ассоциации локуса rs2250889 (C>G) гена *MMP9* с РМЖ, и требуется проведение дальнейших исследований для уточнения имеющихся данных. Вместе с этим следует отметить, что в литературе имеются достаточно убедительные данные о наличии выраженных межэтнических особенностей ассоциаций ряда генов-кандидатов с многофакторными фенотипами (например, костная масса, глаукома и др.) [59–61] и др.

Литературные материалы [62, 63] и данные онлайн базы HaploReg свидетельствуют о значимой функциональной роли локуса rs2250889 (C>G) гена *MMP9* в организме. Во-первых, данный полиморфизм находится в экзоне 6 гена *MMP9* и замена C>G в с.1721-м положении является несинонимичной и приводит к аминокислотной замене аргинина на пролин в 574-м положении белка *MMP9*. Во-вторых, регион генома, в котором находится полиморфный локус rs2250889, является эволюционно консервативным регионом “открытого” хроматина и выполняет функции энхансера регуляторного участка (маркируется метилированным вариантом гистоновых белков фракции H3 – H3K4me1) в более чем 20 различных тканях и органах и в том числе в разных культурах первичных эпителиальных и миоэпителиальных клеток молочной железы (HMEC mammary epithelial primary cells (Epigenome ID: E119, Mnemonic: BRST.HMEC), breast variant human mammary epithelial cells (vHMEC) (Epigenome ID: E028, Mnemonic: BRST.HMEC.35), breast myoepithelial primary cells (Epigenome ID: E027, Mnemonic: BRST.MYO)). В-третьих, участок ДНК, в котором расположен rs2250889, является местом связывания с белком-регулятором CTCF и фактором транскрипции NRSF. Причем нуклеотидная замена C>G (rs2250889) приводит к снижению афинности регуляторного мотива ДНК к транскрипционному фактору NRSF.

В настоящей работе обнаружено, что у женщин Центрально-Черноземного района России без отягощенной наследственности повышенный риск возникновения РМЖ связан с генотипом *AA* rs3787268 (G>A) гена *MMP9* (ОШ = 2.16). Наши данные согласуются с результатами работы Slatery et al. [21], в которой также показано “рисковое” значение для РМЖ генотипов *AA+GA* в сравнении с генотипом *GG* (ОШ = 1.52) среди женщин США. Также генотипы *AA+GA* ассоциированы с выживаемостью больных РМЖ у населения юго-восточного Китая [56]. Вместе с этим в трех исследованиях – одном экспериментальном [55] и двух метаанализах [22, 23] не было выявлено ассоциации локуса rs3787268 (G>A) гена *MMP9* с заболеванием, а в других двух работах (также экспериментальной (изучалась китайская популяция Han [25]) и метаанализе [24]), наоборот, аллельный вариант *A* rs3787268 имел протективное значение для РМЖ (ОШ = 0.82). Вышеприведенные материалы указывают на противоречивость имеющихся на настоящий момент времени данных об ассоциации локуса rs3787268 (G>A) гена *MMP9* с РМЖ и необходимо проведение дальнейших генетико-эпидемиологических исследований по этому вопросу.

Согласно базе данных по эпигенетике HaploReg и литературным материалам [63] полиморфный вариант rs3787268 находится в интроне (с.1331–163G>A) гена *MMP9*, который является функционально активным регионом генома (регион “открытого” хроматина) и выполняет важную регуляторную роль – является энхансером для этого гена (маркируется метилированным белком-гистоном H3K4me1) в различных тканях и органах и в том числе в первичных эпителиальных и миоэпителиальных клетках молочной железы (breast myoepithelial primary cells (Epigenome ID: E027, Mnemonic: BRST.MYO), breast variant human mammary epithelial cells (vHMEC) (Epigenome ID: E028, Mnemonic: BRST.HMEC.35)). Также регион ДНК, в котором расположен локус rs3787268, является сайтом связывания с шестью факторами транскрипции (Sox, HDAC2, p300, Pou1f1, Mef2 и Zfp105). Следует отметить, что замена нуклеотида G>A в позиции с.1331–163 (rs3787268) обуславливает повышение афинности ко всем шести вышеуказанным факторам транскрипции.

Матриксная металлопротеиназа 9 (синоним: желатиназа В) является коллагеназой IV типа (способна разрушать коллаген IV типа и денатурированные коллагены и приводить за счет этого к разрушению базальных мембран) и вследствие этого имеет важное значение в патофизиологии РМЖ: *MMP9* вовлечена в процессы прогрессирования и метастазирования заболевания [22, 64]. Литературные данные указывают на то, что экспрессия *MMP9* повышена при РМЖ [18], и в опухолевой ткани наблюдаются более высокие концентрации

ММР9 в сравнении с нормальной тканью молочной железы [15]. Экспрессия ММР9 имеет прогностическое значение для общей и безрецидивной выживаемости пациенток РМЖ [22]. В результате проведенного метаанализа (в исследование включены данные о 2344 пациентках с РМЖ из 15 ранее выполненных работ) установлено, что высокая экспрессия ММР9 повышает риск рецидива и ухудшает выживаемость у больных РМЖ [65].

Следует отметить, что генетические варианты *ММР*, которые определяют подверженность РМЖ у женщин Центрально-Черноземного района России, за счет “многогранных” медико-биологических эффектов детерминируемых ими матриксных металлопротеиназ (протеолитическое расщепление различных компонентов соединительнотканного матрикса, изменение продукции ламинина, фибронектина и др.), имеющих “ключевое” значение в ремоделировании внеклеточного матрикса, обладают выраженными плеiotропными эффектами в организме — вовлечены в патофизиологию достаточно широкого спектра часто встречающихся заболеваний человека и в том числе, как показали результаты ранее проведенных исследований в популяции Центрально-Черноземного района России (данная популяция рассматривается в данной работе), таких заболеваний как артериальная гипертензия, цереброваскулярные заболевания, первичная открытоугольная глаукома, язвенная болезнь [52, 53, 62, 63, 66] и др. Эти данные указывают на “ключевую” роль генов матриксных металлопротеиназ в организме как в норме, так и при патологии, и проводимые генетико-эпидемиологические исследования в этой области позволяют установить синтропные и “специфические” генетические варианты генов *ММР*, определяющие подверженность к различным заболеваниям человека.

В результате проведенного исследования обнаружены различия в ассоциациях полиморфных локусов генов-кандидатов *ММР* с РМЖ у женщин с учетом наличия/отсутствия у них отягощенного семейного анамнеза. Среди женщин с отягощенным семейным анамнезом низкий риск развития заболевания связан с полиморфными локусами rs243865 гена *ММР2* (ОШ = 0.53–0.54 для аллеля *T*) и rs2250889 гена *ММР9* (ОШ = 0.36–0.37 для аллеля *G*). У женщин без отягощенной наследственности высокий риск развития РМЖ ассоциирован с rs3787268 *ММР9* (ОШ = 2.16 для аллеля *A*) и гаплотипами шести изученных полиморфных локусов (rs3918242; rs3918249; rs17576; rs3787268; rs2250889; rs17577) гена *ММР9* ($p_{\text{perm}} \leq 0.05$).

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ “Изучение генетических факторов репродуктивного здоровья женщин” (МД-3284.2022.1.4).

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. *Gradishar W.J., Anderson B.O., Blair S.L. et al.* Breast cancer version 3.2014 // J. Natl Compr. Canc. Netw. 2014. V. 12 (4). P. 542–590.
2. *Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I. et al.* Cancer statistics for the year 2020: An overview // Int. J. Cancer. 2021. V. 149. P. 778–789. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>
3. *Sung H., Ferlay J., Siegel R.L. et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // CA Cancer J. Clin. 2021. V. 71. P. 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
4. Здравоохранение в России. 2021: Стат.сб./Росстат. М., 2021. 171 с.
5. *Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В.* Злокачественные новообразования в России в 2018 г. М., 2019. 250 с.
6. *Lilquist J., Ruddy K.J., Vachon C.M., Couch F.J.* Common genetic variation and breast cancer risk—past, present, and future // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2018. V. 27 (4). P. 380–394. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-17-1144>
7. *Shiovitz S., Korde L.A.* Genetics of breast cancer: A topic in evolution // Ann. Oncol. 2015. V. 26 (7). P. 1291–1299. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv022>
8. *Павлова Я.В., Мингажева Э.Т., Прокофьева Д.С. и др.* Рак яичников в составе наследственных онкологических синдромов (обзор) // Науч. результаты биомед. исследований. 2021. Т. 7. № 4. С. 330–362. <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2021-7-4-0-2>
9. <https://www.ebi.ac.uk/gwas/search?query=breast%20carcinoma>
10. *Michailidou K., Lindström S., Dennis J. et al.* Association analysis identifies 65 new breast cancer risk loci // Nature. 2017. V. 551(7678). P. 92–94. <https://doi.org/10.1038/nature24284>
11. *Mucci L.A., Hjelmborg J.B., Harris J.R. et al.* Familial risk and heritability of cancer among twins in nordic countries // JAMA. 2016. V. 315(1). P. 68–76. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.17703>
12. *Radisky E.S., Radisky D.C.* Matrix metalloproteinases as breast cancer drivers and therapeutic targets // Front Biosci. (Landmark Ed). 2015. V. 20(7). P. 1144–1163. <https://doi.org/10.2741/4364>
13. *Eiro N., Gonzalez L.O., Fraile M. et al.* Breast cancer tumor stroma: Cellular components, phenotypic heterogeneity, intercellular communication, prognostic im-

- plications and therapeutic opportunities // *Cancers* (Basel). 2019. V. 11 (5). P. 664.
<https://doi.org/10.3390/cancers11050664>
14. Baker E.A., Stephenson T.J., Reed M.W., Brown N.J. Expression of proteinases and inhibitors in human breast cancer progression and survival // *Mol. Pathol.* 2002. V. 55(5). P. 300–304.
<https://doi.org/10.1136/mp.55.5.300>
 15. Przybyłowska K., Kluczna A., Zadrozny M. et al. Polymorphisms of the promoter regions of matrix metalloproteinases genes MMP-1 and MMP-9 in breast cancer // *Breast Cancer Res. Treat.* 2006. V. 95(1). P. 65–72.
 16. McColgan P., Sharma P. Polymorphisms of matrix metalloproteinases 1, 2, 3 and 9 and susceptibility to lung, breast and colorectal cancer in over 30000 subjects // *Int. J. Cancer.* 2009. V. 125 (6). P. 1473–1478.
<https://doi.org/10.1002/ijc.24441>
 17. Zhou P., Du L.F., Lv G.Q. et al. Current evidence on the relationship between four polymorphisms in the matrix metalloproteinases (MMP) gene and breast cancer risk: A meta-analysis // *Breast Cancer Res. Treat.* 2011. V. 127 (3). P. 813–818.
<https://doi.org/10.1007/s10549-010-1294-0>
 18. Liu D., Guo H., Li Y. et al. Association between polymorphisms in the promoter regions of matrix metalloproteinases (MMPs) and risk of cancer metastasis: A meta-analysis // *PLoS One.* 2012. V. 7 (2). P. e31251.
 19. Białkowska K., Marciniak W., Muszyńska M. et al. Polymorphisms in MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-13 and MT2A do not contribute to breast, lung and colon cancer risk in polish population // *Hered. Cancer Clin. Pract.* 2020. V. 18. P. 16.
 20. Delgado-Enciso I., Cepeda-Lopez F.R., Monrroy-Guizar E.A. et al. Matrix metalloproteinase-2 promoter polymorphism is associated with breast cancer in a Mexican population // *Gynecol. Obstet. Invest.* 2008. V. 65 (1). P. 68–72.
 21. Slattery M.L., John E., Torres-Mejia G. et al. Matrix metalloproteinase genes are associated with breast cancer risk and survival: The breast cancer health disparities study // *PLoS One.* 2013. V. 8. P. e63165.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063165>
 22. Zhang X., Jin G., Li J., Zhang L. Association between four MMP-9 polymorphisms and breast cancer risk: A meta-analysis // *Med. Sci. Monit.* 2015. V. 21. P. 1115–1123.
<https://doi.org/10.12659/MSM.893890>
 23. Xu T., Zhang S., Qiu D. et al. Association between matrix metalloproteinase 9 polymorphisms and breast cancer risk: An updated meta-analysis and trial sequential analysis // *Gene.* 2020. V. 759. P. 144972.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144972>
 24. Yan C., Sun C., Lu D. et al. Estimation of associations between MMP9 gene polymorphisms and breast cancer: Evidence from a meta-analysis // *Int. J. Biol. Markers.* 2022. P. 17246008221076145.
<https://doi.org/10.1177/17246008221076145>
 25. Wang K., Zhou Y., Li G. et al. MMP8 and MMP9 gene polymorphisms were associated with breast cancer risk in a Chinese Han population // *Sci. Rep.* 2018. V. 8(1). P. 13422.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-31664-3>
 26. Tikunova E., Ovtcharova V., Reshetnikov E. et al. Genes of tumor necrosis factors and their receptors and the primary open angle glaucoma in the population of Central Russia // *Int. J. Ophthalmol.* 2017. V. 10. P. 1490–1494.
<https://doi.org/10.18240/ijo.2017.10.02>
 27. Reshetnikov E., Ponomarenko I., Golovchenko O. et al. The VNTR polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene and blood pressure in women at the end of pregnancy // *Taiwan J. Obstet. Gynecol.* 2019. V. 58(3). P. 390–395.
<https://doi.org/10.1016/j.tjog.2018.11.035>
 28. Ward L.D., Kellis M. HaploReg v4: Systematic mining of putative causal variants, cell types, regulators and target genes for human complex traits and disease // *Nucl. Acids Res.* 2016. V. 44(D1). P. D877–D881.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv1340>
 29. Ponomarenko I., Reshetnikov E., Polonikov A. et al. Candidate genes for age at menarche are associated with endometrial hyperplasia // *Gene.* 2020. V. 757. P. 144933.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144933>
 30. Reshetnikov E., Zarudskaya O., Polonikov A. et al. Genetic markers for inherited thrombophilia are associated with fetal growth retardation in the population of Central Russia // *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2017. V. 43(7). P. 1139–1144.
<https://doi.org/10.1111/jog.13329>
 31. Golovchenko O., Abramova M., Ponomarenko I. et al. Functionally significant polymorphisms of ESR1 and PGR and risk of intrauterine growth restriction in population of Central Russia // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2020. V. 253. P. 52–57.
<https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2020.07.045>
 32. Purcell S., Neale B., Todd-Brown K. et al. PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses // *Am. J. Hum. Genet.* 2007. V. 81(3). P. 559–575.
<https://doi.org/10.1086/519795>
 33. Ponomarenko I., Reshetnikov E., Polonikov A. et al. Candidate genes for age at menarche are associated with endometriosis // *Reprod. Biomed. Online.* 2020. V. 41(5). P. 943–956.
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.04.016>
 34. Che R., Jack J.R., Motsinger-Reif A.A., Brown C.C. An adaptive permutation approach for genome-wide association study: evaluation and recommendations for use // *BioData Min.* 2014. V. 7. P. 9.
<https://doi.org/10.1186/1756-0381-7-9>
 35. Pers T.H., Karjalainen J.M., Chan Y. et al. Biological interpretation of genome-wide association studies using predicted gene functions // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 5890.
<https://doi.org/10.1038/ncomms6890>
 36. Tak Y.G., Farnham P.J. Making sense of GWAS: Using epigenomics and genome engineering to understand the functional relevance of SNPs in non-coding regions of the human genome // *Epigenetics & Chromatin.* 2015. V. 8. P. 57.
<https://doi.org/10.1186/s13072-015-0050-4>
 37. Ponomarenko I., Reshetnikov E., Polonikov A. et al. Candidate genes for age at menarche are associated with uterine leiomyoma // *Front. Genet.* 2021. V. 11. P. 512940.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2020.512940>

38. Zhou Y., Yu C., Miao X. *et al.* Substantial reduction in risk of breast cancer associated with genetic polymorphisms in the promoters of the matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 genes // *Carcinogenesis*. 2004. V. 25(3). P. 399–404.
39. Saeed H.M., Alanazi M.S., Alshahrani O. *et al.* Matrix metalloproteinase-2 C(–1306) T promoter polymorphism and breast cancer risk in the Saudi population // *Acta Biochim. Pol.* 2013. V. 60(3). P. 405–409.
40. Yang L., Li N., Wang S. *et al.* Lack of association between the matrix metalloproteinase-2–1306C>T polymorphism and breast cancer susceptibility: A meta-analysis // *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2014. V. 15(12). P. 4823–4827.
41. Nájima D.B., Zarkouna Y.B., Gammoudi A. *et al.* Prognostic impact of polymorphism of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase tissue inhibitor-2 promoters in breast cancer in tunisia: case-control study // *Tumour Biol.* 2015. V. 36(5). P. 3815–3822. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-3023-5>
42. Habel A.F., Ghali R.M., Bouaziz H. *et al.* Common matrix metalloproteinase-2 gene variants and altered susceptibility to breast cancer and associated features in Tunisian women // *Tumour Biol.* 2019. V. 41(4). P. 1010428319845749. <https://doi.org/10.1177/1010428319845749>
43. Lei H., Hemminki K., Altieri A. *et al.* Promoter polymorphisms in matrix metalloproteinases and their inhibitors: Few associations with breast cancer susceptibility and progression // *Breast Cancer Res. Treat.* 2007. V. 103(1). P. 61–69.
44. Zagouri F., Sergeantanis T.N., Gazouli M. *et al.* MMP-2 –1306C>T polymorphism in breast cancer: a case-control study in a south European population // *Mol. Biol. Rep.* 2013. V. 40(8). P. 5035–5040.
45. Roehe A.V., Frazzon A.P., Agnes G. *et al.* Detection of polymorphisms in the promoters of matrix metalloproteinases 2 and 9 genes in breast cancer in South Brazil: preliminary results // *Breast Cancer Res. Treat.* 2007. V. 102. P. 123–124.
46. Beeghly-Fadiel A., Lu W., Long J.R. *et al.* Matrix metalloproteinase-2 polymorphisms and breast cancer susceptibility // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2009. V. 18(6). P. 1770–1776. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-09-0125>
47. Ledwoń J.K., Hennig E.E., Maryan N. *et al.* Common low-penetrance risk variants associated with breast cancer in Polish women // *BMC Cancer.* 2013. V. 13. P. 510. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-510>
48. Manshadi Z.D., Hamid M., Kosari F. *et al.* The relationship between matrix metalloproteinase gene polymorphisms and tumor type, tumor size, and metastasis in women with breast cancer in Central Iran // *Middle East J. Cancer.* 2018. V. 9 (2). P. 123–131.
49. Ou Y.X., Bi R. Meta-analysis on the relationship between the SNP of MMP-2 –1306C>T and susceptibility to breast cancer // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2020. V. 24(3). P. 1264–1270. https://doi.org/10.26355/eurrev_202002_20181
50. Shevchenko A.V., Konenkov V.I., Garbukov E.Iu., Stakheeva M.N. Associating of polymorphism in the promoter regions of genes of metalloproteinase (MMP2, MMP3, MMP9) with options of the clinical course of breast cancer in Russian women // *Vopr. Onkol.* 2014. V. 60(5). P. 630–635. Russian.
51. Price S.J., Greaves D.R., Watkins H. Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene: Role of Sp1 in allele-specific transcriptional regulation // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276(10). P. 7549–7558.
52. Polonikov A., Rymarova L., Klyosova E. *et al.* Matrix metalloproteinases as target genes for gene regulatory networks driving molecular and cellular pathways related to a multistep pathogenesis of cerebrovascular disease // *J. Cell Biochem.* 2019. V. 120(10). P. 16467–16482. <https://doi.org/10.1002/jcb.28815>
53. Moskalenko M., Ponomarenko I., Reshetnikov E. *et al.* Polymorphisms of the matrix metalloproteinase genes are associated with essential hypertension in a Caucasian population of Central Russia // *Sci. Rep.* 2021. V. 11(1). P. 5224. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84645-4>
54. Москаленко М.И. Вовлеченность генов матричных металлопротеиназ в формирование артериальной гипертензии и ее осложнений (обзор) // *Науч. результат. Медицина и фармация.* 2018. Т. 4. № 1. С. 53–69. <https://doi.org/10.18413/2313-8955-2018-4-1-53-69>
55. Beeghly-Fadiel A., Lu W., Shu X.O. *et al.* MMP9 polymorphisms and breast cancer risk: A report from the shanghai breast cancer genetics study // *Breast Cancer Res. Treat.* 2011. V. 126(2). P. 507–513. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-1119-1>
56. Fu F., Wang C., Chen L.M. *et al.* The influence of functional polymorphisms in matrix metalloproteinase 9 on survival of breast cancer patients in a Chinese population // *DNA Cell Biol.* 2013. V. 32(5). P. 274–282. <https://doi.org/10.1089/dna.2012.1928>
57. Chahil J.K., Munretnam K., Samsudin N. *et al.* Genetic polymorphisms associated with breast cancer in malaysian cohort // *Indian J. Clin. Biochem.* 2015. V. 30(2). P. 134–139. <https://doi.org/10.1007/s12291-013-0414-0>
58. Al-Eitan L.N., Jamous R.I., Khasawneh R.H. Candidate gene analysis of breast cancer in the Jordanian population of arab descent: A case-control study // *Cancer Invest.* 2017. V. 35(4). P. 256–270. <https://doi.org/10.1080/07357907.2017.1289217>
59. Dvornyk V., Liu X.H., Shen H. *et al.* Differentiation of Caucasians and Asians at bone mass candidate genes: Implication for ethnic difference of bone mass // *Ann Hum. Genet.* 2003. V. 67. P. 216–227.
60. Pasutto F., Zenkel M., Hoja U. *et al.* Pseudoexfoliation syndrome-associated genetic variants affect transcription factor binding and alternative splicing of LOXL1 // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 15466. <https://doi.org/10.1038/ncomms15466>
61. Eliseeva N., Ponomarenko I., Reshetnikov E. *et al.* LOXL1 gene polymorphism candidates for exfoliation

- glaucoma are also associated with a risk for primary open-angle glaucoma in a Caucasian population from Central Russia // *Mol. Vis.* 2021. V. 27. P. 262–269.
62. *Starikova D., Ponomarenko I., Reshetnikov E. et al.* Novel data about association of the functionally significant polymorphisms of the MMP-9 gene with exfoliation glaucoma in the Caucasian population of Central Russia // *Ophthalmic. Res.* 2021. V. 64(3). P. 458–464. <https://doi.org/10.1159/000512507>
 63. *Minyaylo O., Ponomarenko I., Reshetnikov E. et al.* Functionally significant polymorphisms of the MMP-9 gene are associated with peptic ulcer disease in the Caucasian population of Central Russia // *Sci. Rep.* 2021. V. 11(1). P. 13515. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92527-y>
 64. *Jones J.L., Walker R.A.* Control of matrix metalloproteinase activity in cancer // *J. Pathol.* 1997. V. 183(4). P. 377–379.
 65. *Song J., Su H., Zhou Y.Y., Guo L.L.* Prognostic value of matrix metalloproteinase 9 expression in breast cancer patients: a meta-analysis // *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2013. V. 14(3). P. 1615–1621.
 66. *Moskalenko M.I., Milanova S.N., Ponomarenko I.V. et al.* Study of associations of polymorphism of matrix metalloproteinases genes with the development of arterial hypertension in men // *Kardiologiya.* 2019. V. 59(7S). P. 31–39. Russian. <https://doi.org/10.18087/cardio.2598>

Associations of Polymorphic Loci of Matrix Metalloproteinase Genes with the Development of Breast Cancer in Women Central Chernozem Region of Russia

N. V. Pavlova^a, I. V. Ponomarenko^a, V. S. Orlova^a, I. V. Batlutskaya^a,
O. A. Efremova^a, and M. I. Churnosov^a, *

^aBelgorod State University, Belgorod, 308015 Russia

*e-mail: churnosov@bsu.edu.ru

The association of polymorphic variants of matrix metalloproteinase (*MMP*) genes with breast cancer (BC) in women of the Central Chernozem region of Russia, taking into account the presence/absence of a burdened family history, was studied. The study included 358 patients with breast cancer (68 patients had a burdened family history) and 746 women of the control group. Genotyping of 10 polymorphic loci of *MMP* genes (rs1799750 *MMP1*; rs243865 *MMP2*; rs679620 *MMP3*; rs1940475 *MMP8*; rs17576, rs17577, rs3918242, rs2250889, rs3787268, rs3918249 *MMP9*) was performed. To study the associations of polymorphic variants of *MMP* genes with breast cancer in two subgroups, taking into account the presence/absence of a burdened family history (the control group for these two subgroups was the same), the method of logistic regression analysis was used. It was revealed that a low risk of developing the disease among women with a burdened family history is associated with polymorphisms rs243865 *MMP2* (OR = 0.53–0.54, $p_{\text{perm}} \leq 0.03$) and rs2250889 *MMP9* (OR = 0.36–0.37, $p_{\text{perm}} \leq 0.04$). In women without burdened heredity, an increased risk of developing breast cancer is associated with rs3787268 *MMP9* (OR = 2.16, $p_{\text{perm}} = 0.03$) and haplotypes of polymorphic loci of the *MMP9* gene ($p_{\text{perm}} \leq 0.05$): CA rs3918249–rs17576 (OR = 2.15), CCA rs3918242–rs3918249–rs17576 (OR = 1.69), CCAG rs3918242–rs3918249–rs17576–rs3787268 (OR = 1.69), CAGCG rs3918249–rs17576–rs3787268–rs2250889–rs17577 (OR = 3.06). Three haplotypes are associated with a low risk of breast cancer in women without burdened heredity: GG rs17576–rs3787268 (OR = 0.60), GGC rs17576–rs3787268–rs2250889 (OR = 0.63), and CGG rs3918249–rs17576–rs3787268 (OR = 0.62).

Keywords: breast cancer, matrix metalloproteinase genes, polymorphic loci, association, hereditary burden.

РОЛЬ ГЕНА *CRP* ВО ВЛИЯНИИ НЕВЗГОД ДЕТСТВА НА РИСК СУИЦИДАЛЬНЫХ ПОПЫТОК У БОЛЬНЫХ С РАССТРОЙСТВАМИ ШИЗОФРЕНИЧЕСКОГО СПЕКТРА¹

© 2023 г. М. В. Алфимова¹ *, Т. В. Лежейко¹, М. В. Габаева¹,
В. В. Плакунова¹, В. А. Михайлова¹, В. Г. Каледа¹, В. Е. Голимбет¹

¹Научный центр психического здоровья, Москва, 115522 Россия

*e-mail: m.alfimova@gmail.com

Поступила в редакцию 23.03.2022 г.

После доработки 05.05.2022 г.

Принята к публикации 26.05.2022 г.

Исследования показывают, что, в отличие от циркулирующего С-реактивного белка (СРБ), генетические варианты, обеспечивающие более высокие уровни СРБ, обладают защитным действием против шизофрении и модифицируют влияние сезона рождения на развитие заболевания. Целью данной работы было установить, влияет ли ген *CRP* также на связь между невзгодами детства и клиническими характеристиками шизофрении. У 921 больного шизофренией были проанализированы взаимосвязи между неблагополучием в детстве, генотипами в сайте rs2794521 в локусе *CRP*, синдромами, измеряемыми с помощью 5-факторной модели Шкалы позитивных и негативных синдромов с встроеной 2-факторной моделью негативного синдрома, и историей суицидальных попыток. Обнаружено значимое влияние генотипа на суицидальные попытки у пациентов с невзгодами детства. Результат свидетельствует в пользу модифицирующей роли генетических детерминант воспаления в каскаде событий, опосредующих эффекты пережитого в раннем возрасте психологического стресса на последующий риск суицидальных попыток.

Ключевые слова: психоз, ген, С-реактивный белок, невзгоды детства, психопатология, суицидальность.

DOI: 10.31857/S0016675823020029, **EDN:** KWXQKF

Предполагается, что шизофрения является результатом взаимодействия генетических и средовых факторов. Хотя многие из них были идентифицированы [1, 2], механизмы, опосредующие их влияние на заболевание, в значительной степени неизвестны. Однако появляется все больше свидетельств того, что различные генетические и средовые факторы риска сходятся в способности вызывать нейровоспаление [3]. В частности, один из предполагаемых путей влияния такого средового фактора риска как невзгоды детства (НД) на психическое здоровье во взрослом возрасте заключается в том, что гормоны стресса вызывают экспрессию генов, ответственных за легкое хроническое воспаление [4], что может привести к нейровоспалению и нарушению формирования нейронных сетей мозга [3]. Если это так, то генетический полиморфизм иммунной системы может влиять на связь средового стресса с психозом, и его исследование могло бы пролить свет на молекулярные события, лежащие между стрессом и симптомами шизофрении.

С-реактивный белок (СРБ) является широко используемым индикатором хронического системного воспаления. При психозах его концентрация в крови коррелирует с тяжестью симптомов [5] и суицидальными наклонностями [6]. Известно, что уровни СРБ находятся под существенным генетическим контролем; при этом наибольшее влияние оказывает полиморфизм гена *CRP* [7]. *CRP* не является локусом риска шизофрении согласно полногеномным ассоциативным исследованиям (GWAS) [1], тем не менее анализ методом Менделевской рандомизации (MR) показал, что полигенные показатели, ассоциированные с более высокими уровнями СРБ, снижают вероятность развития психоза [7, 8]. На этом основании было высказано предположение, что генетические особенности выработки СРБ могут определять реакцию организма на некоторые средовые воздействия, связанные с риском шизофрении, в частности на перинатальную инфекцию [7]. Чтобы проверить эту гипотезу, мы ранее исследовали влияние взаимодействия *CRP* и сезона рождения на риск и клинические характеристики шизофрении и обнаружили его эффект на возраст начала заболевания [9].

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0016675823020029 для авторизованных пользователей.

В данном исследовании мы сосредоточились на роли *CRP* в связи между НД и проявлениями шизофрении. НД, определяемые как жестокое обращение в детстве или дисфункциональная родительская семья, являются твердо установленным, хотя и неспецифическим фактором риска заболевания [2]. Многочисленные обзоры и метаанализы связывают НД с симптомами шизофрении [10], а также с депрессией, тревогой и суицидальными наклонностями [11]. Повышенные уровни СРБ в крови у переживших НД взрослых, в том числе у лиц, страдающих психозом [12], позволяют предположить, что ген *CRP* может играть роль в каскаде событий, опосредующих эту взаимосвязь.

Мы использовали полиморфный сайт rs2794521 (A > G), расположенный выше кодирующей последовательности гена *CRP*, в качестве показателя генетических особенностей выработки белка. Этот сайт находится в неравновесии по сцеплению с rs2794520 ($D' = 0.99$; $R^2 = 0.15$; [13]), для которого был получен наиболее сильный сигнал в самом большом GWAS уровней СРБ в плазме крови [7]. Минорный аллель rs2794521 G связан с более низкими уровнями СРБ в крови [14], а также сниженной транскрипционной активностью и связыванием белка *in vitro* [15].

Цель работы заключалась в исследовании влияния rs2794521 гена *CRP* на симптоматику и суицидальные попытки при шизофрении в контексте НД. Для оценки симптоматики мы использовали пятифакторную модель, которая включает позитивный, негативный, когнитивно-дезорганизационный, депрессивно-тревожный синдромы и синдром враждебности. При этом негативный синдром был разбит на два подсиндрома — социальной амотивации и ослабленной экспрессии [16]. Учитывая наше предыдущее исследование [9], в анализ также включили возраст начала заболевания. Мы предполагали, что G-аллель будет коррелировать с более тяжелыми проявлениями заболевания у пациентов с НД, в то время как у пациентов без НД такой корреляции не будет.

В исследовании принял участие 921 пациент из двух психиатрических стационаров Москвы. Критериями включения были: 1) диагноз одного из расстройств шизофренического спектра по Международной классификации болезней (МКБ-10, F2); 2) возраст 16 лет или старше; 3) европеоидное этническое происхождение; 4) отсутствие сопутствующих заболеваний, ведущих к интеллектуальной недостаточности; 5) наличие информации об НД пациента. Эта выборка на 47% перекрывалась с выборкой нашего предыдущего исследования об ассоциации *CRP* и сезона рождения [9].

Настоящее исследование одобрено Этическим комитетом НЦПЗ (№ 98/11.09.2007). Все участники подписали информированное согласие, сдали ве-

нозную кровь для выделения ДНК и прошли стандартное клиническое обследование.

Для сбора информации об НД и суицидальных попытках были проанализированы истории болезни пациентов. Кроме того, пациентам задавали серию вопросов для заполнения специально разработанной анкеты о социально-демографических характеристиках больного. В соответствии с литературой [17], список НД включал: 1) категорию жестокого обращения в детстве (а именно: физическое или сексуальное насилие, виктимизацию сверстниками и изъятие ребенка у биологических родителей для воспитания в интернате или приемной семье), а также 2) семейную дисфункцию, включая наличие у родителей психического заболевания, злоупотребления психоактивными веществами, суицидальных наклонностей, криминальной истории, а также насилие в семье. Информация считалась достаточной для включения кандидата в выборку при наличии доказательств присутствия любого из перечисленных событий или отсутствия всех этих событий. Данные о суицидальном поведении были получены на 875 из 921 пациента с информацией об НД.

Симптоматика оценивалась с использованием Шкалы позитивных и негативных синдромов (PANSS [18]); баллы для факторов и субфакторов рассчитывали в соответствии с недавним метаанализом 5-факторных моделей PANSS (табл. П1 Приложения; [16]).

ДНК из крови выделяли стандартным фенол-хлороформным методом. Генотипирование проводили с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с флуоресцентными зондами. Праймеры и условия реакции описаны ранее [9].

Статистический анализ осуществляли с помощью JASP 0.16 [19]. Главные эффекты и эффект взаимодействия генотипа и НД на четыре синдрома и два негативных субсиндрома, а также на возраст начала заболевания оценивали с использованием анализа ковариации (ANCOVA) с учетом пола и возраста. Для анализа суицидальных попыток применяли χ^2 Пирсона и логистическую регрессию. Уровень значимости был установлен на уровне $\alpha = 0.05$ (двусторонний критерий), с поправкой Бонферрони на восемь анализируемых параметров. Анализ мощности с использованием Quanto (<http://www.mybiosoftware.com/quanto-1-2-4-computes-sample-size-power-association-studies.htm>) показал, что при $\alpha = 0.05$, аддитивной модели, частоте минорного аллеля 0.24 и размерах эффектов генотипа и среды $R^2 = 0.01$ мощности выборки будет достаточно (>85%) для выявления даже небольших эффектов генотип-средового взаимодействия $R^2 \geq 0.01$.

Частоты генотипов составили: AA = 0.58, AG = 0.36 и GG = 0.06, что соответствовало равнове-

Таблица 1. Клинические и демографические характеристики групп с невзгодами детства (НД+) и без таковых (НД–)

Параметр	НД–	НД+
<i>n</i>	468	453
Пол (% женщин)	58%	63%
Возраст (годы)	34.55 ± 13.67	34.39 ± 12.39
Образование (% высшего) ^а	60%	45%
Возраст начала болезни (годы)	24.96 ± 10.01	23.98 ± 9.24
Длительность болезни (годы)	9.56 ± 10.79	10.28 ± 10.50
% диагнозов “шизофрения” (F20)	85%	86%
Синдромы PANSS		
позитивный	21.95 ± 6.25	22.01 ± 6.51
негативный, ослабленная экспрессия	11.48 ± 4.21	11.81 ± 4.33
негативный, социальная амотивация	9.02 ± 3.89	9.42 ± 4.00
когнитивно-дезорганизационный	23.60 ± 6.92	23.98 ± 6.85
депрессивно-тревожный	7.18 ± 3.29	7.40 ± 3.49
враждебности	12.67 ± 5.43	12.72 ± 5.12
% лиц с суицидальными попытками ^б	16.48	21.67

Примечание. ^а — полная информация об уровне образования имела для 876 пациентов, разница в уровне образования между больными с НД и без таковых значима ($\chi^2 = 18.89$, $df = 1$, $n = 876$, $p < 0.001$); ^б информация о суицидальном поведении имела для 455 пациентов из группы без НД и 420 пациентов из группы с НД.

сию Харди–Вайнберга; частота *G*-аллеля была равна 0.24. Хотя бы одно событие, относящееся к НД, имелось в анамнезе 49% пациентов. В табл. 1 представлены клинические и демографические характеристики групп с НД и без них. Группы не различались по полу и возрасту, а также по частотам генотипов (см. табл. П4 Приложения). Последнее предполагает отсутствие генотип–средовой корреляции. При этом в группе с НД значительно меньше участников имели или получали высшее образование.

ANCOVA не выявил достоверных главных эффектов или эффектов взаимодействия генотипа и среды на какой-либо синдром/субсиндром или возраст начала заболевания (табл. П2 и П3 Приложения). В то же время влияние генотип–средового взаимодействия на суицидальные попытки было значимым ($\chi^2 = 19.44$, $df = 5$, $n = 875$, $p_{\text{корр}} = 0.016$). Апостериорный анализ показал, что генотип влиял на суицидальность только в группе с НД ($\chi^2 = 12.80$, $df = 2$, $n = 420$, $p = 0.002$); при этом самая большая доля лиц с суицидальными попытками обнаружилась у носителей гомозиготного генотипа *GG*

(рис. 1; табл. П4 Приложения). Пошаговая логистическая регрессия с учетом пола и возраста подтвердила этот результат: наилучшая модель включала пол и эффект генотип–средового взаимодействия; значимые различия имели место между пациентами с генотипом *GG* с НД и пациентами с генотипом *AA* без НД ($OR = 5.37$; 95% CI: 2.10–13.70; $p < 0.001$). Следует отметить, что суицидальность была слабо связана со злоупотреблением психоактивными веществами самим пациентом (вся выборка: $\chi^2 = 2.86$, $df = 1$, $n = 875$, $p = 0.091$; группы с НД и без них: $p = 0.170$ и $p = 0.519$ соответственно; данные о злоупотреблении психоактивными веществами получены из анализа историй болезни), что позволяет предположить, что злоупотребление психоактивными веществами не является посредником в отношениях между НД, *CRP* и суицидальными наклонностями.

В данной работе мы проверяли гипотезу о том, что генетические детерминанты уровней СРБ могут модифицировать влияние НД на тяжесть различных групп симптомов, возраст начала заболевания и суицидальные попытки при шизофрении. Наши данные подтвердили эту гипотезу только для

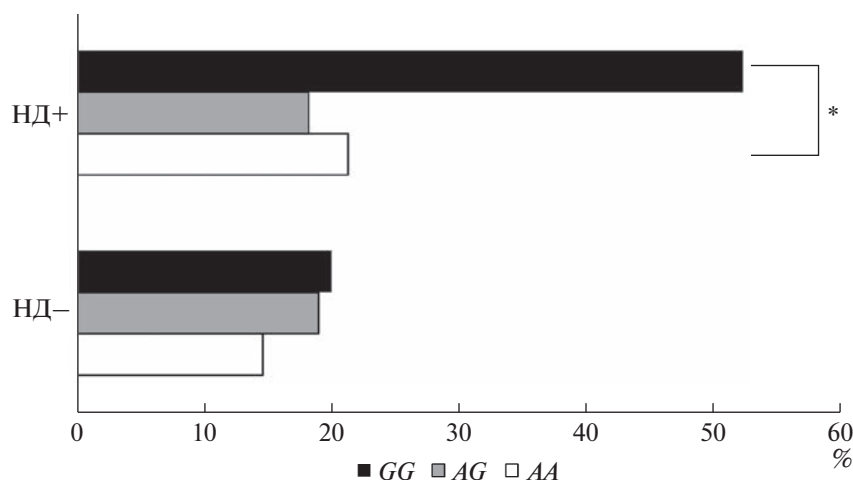


Рис. 1. Процент лиц с суицидальными попытками в группах с различными генотипами *CRP* rs2794521 в выборках больных шизофренией с невзгодами детства (НД+) и без таковых (НД-). * — разница между генотипами в пределах выборки с НД значима, $p = 0.002$.

суицидальных наклонностей. Аллель *G*, ассоциированный с низкой транскрипционной активностью гена, был связан с более высоким уровнем суицидальных попыток в группе с НД. Этот результат согласуется с данными GWAS о протективном действии генотипов, обеспечивающих более высокий уровень СРБ, относительно развития шизофрении [7], с нашими предыдущими данными о корреляции *G*-аллеля с более ранним началом заболевания у пациентов, рожденных в зимний период [9], а также с результатами недавнего анализа методом MR, согласно которому генетические маркеры, которые определяют более низкие уровни СРБ, связаны с повышенным риском членовредительства (независимо от суицидального намерения) в неклинической популяции [20]. Последнее предполагает кросс-диагностическую роль *CRP* в суицидальных наклонностях, несмотря на то что *CRP* не является локусом риска суицидальности по данным GWAS [21]. Следует отметить, что в упомянутой работе [20] не обнаружили связи СРБ с суицидальными попытками, однако уровень суицидальных попыток в использованной выборке оказался намного ниже ожидаемого. Интересно, эти авторы также показали, что связь между НД и членовредительством во взрослом возрасте не была опосредована периферическим уровнем СРБ, измеренным в детстве [22]. Это подтверждает данные, указывающие на несовпадение эффектов циркулирующего в крови СРБ и генетических детерминант СРБ на психиатрические и неклинические фенотипы, и подчеркивает важность дальнейших исследований молекулярных механизмов, лежащих в основе эффектов *CRP* на риск шизофрении и суицидальность.

Основными ограничениями настоящего исследования были использование одного иммун-

ного маркера (СРБ) и одного полиморфного варианта в кодирующем его гене. СРБ оказывает как противовоспалительное, так и провоспалительное действие. Более того, повышенные уровни СРБ могут существовать в отсутствие воспаления. Учитывая это, исследователи отмечают желательность проведения работ с использованием других факторов воспаления, направленных на сравнение эффектов белков, обладающих исключительно про- или противовоспалительным действием [20]. Кроме того, на основании наших результатов можно предположить, что взаимосвязь между НД, *CRP* и суицидальными наклонностями не опосредована тяжестью симптомов, включая те, которые образуют фактор депрессии/тревоги, или злоупотреблением психоактивными веществами. Однако в дальнейших работах следует принимать во внимание больше конфаундеров и потенциальных медиаторов эффектов генотип-средового взаимодействия, например, таких как импульсивность и исполнительно-регуляторные функции.

В целом, результаты настоящего исследования свидетельствуют о модифицирующей роли *CRP* во влиянии НД на риск суицидальных попыток у больных шизофренией. Таким образом они расширяют данные о защитном эффекте генетических вариантов, обеспечивающих более высокие уровни СРБ, на риск и течение шизофрении.

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

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. The Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, *Ripke S., Walters J.T.R., O'Donovan M.C.* Mapping genomic loci prioritises genes and implicates synaptic biology in schizophrenia // *medRxiv*. 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.09.12.20192922>
2. *Radua J., Ramella-Cravaro V., Ioannidis J.P.A. et al.* What causes psychosis? An umbrella review of risk and protective factors // *World Psychiatry*. 2018. V. 17. № 1. P. 49–66. <https://doi.org/10.1002/wps.20490>
3. *Comer A.L., Carrier M., Tremblay M.È., Cruz-Martín A.* The inflamed brain in schizophrenia: the convergence of genetic and environmental risk factors that lead to uncontrolled neuroinflammation // *Front. Cell. Neurosci.* 2020. V. 14. e274. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00274>
4. *Singh B., Chaudhuri T.K.* Role of C-reactive protein in schizophrenia: An overview // *Psychiatry Res.* 2014. V. 216. P. 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2014.02.004>
5. *Fond G., Lançon C., Auquier P., Boyer L.* C-reactive protein as a peripheral biomarker in schizophrenia. An updated systematic review // *Front. Psychiatry*. 2018. V. 9. e392. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2018.00392>
6. *Miola A., Dal Porto V., Tadmor T. et al.* Increased C-reactive protein concentration and suicidal behavior in people with psychiatric disorders: A systematic review and meta-analysis // *Acta Psychiatr. Scand.* 2021. V. 144. P. 537–552. <https://doi.org/10.1111/acps.13351>
7. *Ligthart S., Vaez A., Vösa U. et al.* Genome analyses of >200000 individuals identify 58 loci for chronic inflammation and highlight pathways that link inflammation and complex disorders // *Am. J. Hum. Genet.* 2018. V. 103. P. 691–706. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.09.009>
8. *Lin B.D., Alkema A., Peters T. et al.* Assessing causal links between metabolic traits, inflammation and schizophrenia: a univariable and multivariable, bidirectional Mendelian-randomization study // *Int. J. Epidemiol.* 2019. V. 48. P. 1505–1514. <https://doi.org/10.1093/ije/dyz176>
9. *Alfimova M.V., Lezheiko T.V., Smirnova S.V. et al.* Effect of the C-reactive protein gene on risk and clinical characteristics of schizophrenia in winter-born individuals // *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2020. V. 35. P. 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2020.03.014>
10. *Popovic D., Schmitt A., Kaurani L. et al.* Childhood trauma in schizophrenia: Current findings and research perspectives // *Front. Neurosci.* 2019. V. 13. e274. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00274>
11. *Sahle B.W., Reavley N.J., Li W. et al.* The association between adverse childhood experiences and common mental disorders and suicidality: An umbrella review of systematic reviews and meta-analyses // *Eur. Child Adolesc. Psychiatry*. 2021. V. 31. P. 1489–1499. <https://doi.org/10.1007/s00787-021-01745-2>
12. *Baumeister D., Akhtar R., Ciufolini S. et al.* Childhood trauma and adulthood inflammation: A meta-analysis of peripheral C-reactive protein, interleukin-6 and tumor necrosis factor- α // *Mol. Psychiatry*. 2016. V. 21. P. 642–649. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.67>
13. The 1000 Genomes Project Consortium, *Auton A., Brooks L.D. et al.* A global reference for human genetic variation // *Nature*. 2015. V. 526. № 7571. P. 68–74. <https://doi.org/10.1038/nature15393>
14. *Kotlega D., Białecka M., Kurawski M. et al.* Risk factors of stroke and 717A>G (rs2794521) *CRP* gene polymorphism among stroke patients in West Pomerania province of Poland // *Neurol. Neurochir. Pol.* 2014. V. 48. P. 30–34. <https://doi.org/10.1016/j.pjnns.2013.12.001>
15. *Wang L., Lu X., Li Y. et al.* Functional analysis of the C-reactive protein (CRP) gene –717A>G polymorphism associated with coronary heart disease // *BMC Med. Genet.* 2009. V. 10. e73. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-10-73>
16. *Lim K., Peh O.H., Yang Z. et al.* Large-scale evaluation of the positive and negative syndrome scale (PANSS) symptom architecture in schizophrenia // *Asian J. Psychiatr.* 2021. V. 62. e102732. <https://doi.org/10.1016/j.ajp.2021.102732>
17. *Afifi T.O., Salmon S., Garcés I. et al.* Confirmatory factor analysis of adverse childhood experiences (ACEs) among a community-based sample of parents and adolescents // *BMC Pediatrics*. 2020. V. 20. e178. <https://doi.org/10.1186/s12887-020-02063-3>
18. *Kay S.R., Fiszbein A., Opler L.A.* The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia // *Schizophr. Bull.* 1987. V. 13. P. 261–276. <https://doi.org/10.1093/schbul/13.2.261>
19. JASP Team. JASP (Version 0.16)(Computer software). 2021. <https://jasp-stats.org/> [accessed 1 February 2022].
20. *Russell A.E., Ford T., Gunnell D. et al.* Investigating evidence for a causal association between inflammation and self-harm: A multivariable mendelian randomisation study // *Brain Behav. Immun.* 2020. V. 89. P. 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.05.065>
21. *Erlangsen A., Appadurai V., Wang Y. et al.* Genetics of suicide attempts in individuals with and without mental disorders: A population-based genome-wide association study // *Mol. Psychiatry*. 2020. V. 25. P. 2410–2421. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0218-y>
22. *Russell A.E., Heron J., Gunnell D. et al.* Pathways between early-life adversity and adolescent self-harm: The mediating role of inflammation in the avon longitudinal study of parents and children // *J. Child. Psychol. Psychiatry*. 2019. V. 60. P. 1094–1103. <https://doi.org/10.1111/jcpp.13100>

The *CRP* Gene's Role in the Relations between Childhood Adversity and History of Suicide Attempts in Schizophrenia

M. V. Alfimova^a, *, T. V. Lezheiko^a, M. V. Gabaeva^a,
V. V. Plakunova^a, V. A. Mikhailova^a, V. G. Kaleda^a, and V. E. Golimbet^a

^a*Mental Health Research Center, Moscow, 115522 Russia*

**e-mail: m.alfimova@gmail.com*

Research suggests that, in contrast to circulating C-reactive protein (CRP), genetic variants conferring higher CRP levels have protective effects against schizophrenia and moderate influences of season of birth on the development of the disease. This study aimed to explore whether the *CRP* gene also moderates the relations between childhood adversity and clinical characteristics of schizophrenia. The relations between childhood adversity, genotypes at rs2794521 within the *CRP* locus, syndromes measured as five factors and two negative sub-factors of the Positive and Negative Syndrome Scale, and history of suicide attempts were analyzed in 921 schizophrenia patients using analyses of covariances, Pearson's chi-squared test, and logistic regression. A significant effect of genotype on suicide attempts in patients exposed to childhood adversity was found. The result suggests a moderating role of genetic determinants of inflammation in translating early life psychological stress effects into risk of suicide attempts in schizophrenia.

Keywords: psychosis, gene, C-reactive protein, adverse childhood experiences, psychopathology, suicidality.

ПАМЯТИ ЮРИЯ ЕВГЕНЬЕВИЧА ДУБРОВЫ (13.04.1955–26.01.2023)

DOI: 10.31857/S0016675823020145, EDN: CPOKBU

26 января 2023 г. после тяжелой болезни скончался выдающийся ученый-генетик, автор более 150 работ по популяционной генетике человека и радиационной генетике Ю.Е. Дуброва.

Юрий Евгеньевич родился 13 апреля 1955 г. в Киеве. После окончания Киевского государственного университета в 1978 г. он поступил в аспирантуру Института общей генетики АН СССР. Экспериментальную работу Ю.Е. Дуброва выполнял в лаборатории популяционной генетики под руководством Ю.П. Алтухова. В 1981 г. он защитил кандидатскую диссертацию “Роль стабилизирующего отбора в поддержании биохимического полиморфизма популяций”, а в 1992 г. — докторскую диссертацию “Адаптивное значение полиморфизма белков в популяциях человека”. Работая в лаборатории популяционной генетики, Юрий Евгеньевич принял активное участие в начальном периоде исследований биохимического полиморфизма в популяциях человека, на основе которых был разработан подход к оценке темпов мутационного процесса, установлена связь между гетерозиготностью, изменчивостью морфофизиологических признаков и приспособленностью, а также было сформулировано представление об оптимуме гетерозиготности. Будучи еще совсем молодым научным сотрудником, Ю.Е. Дуброва подготовил нескольких аспирантов к защите диссертационных работ. Яркий, талантливый ученый, прекрасный лектор Ю.Е. Дуброва активно участвовал и в общественной жизни института, всегда откликаясь на запросы времени.

В 1994 г. Юрий Евгеньевич начал работать на кафедре генетики Лестерского университета в Великобритании (Department of Genetics, University of Leicester), где продолжил начатые в России исследования генетических эффектов радиации и химических мутагенов в популяциях млекопитающих. Основным направлением работ Ю.Е. Дубровы в Великобритании стала разработка методов мониторинга мутационного процесса в зародышевой линии млекопитающих. Он впервые получил экспериментальные доказательства радиационной индукции мутаций в зародышевой линии человека. Используя другой класс локусов, он охарактеризовал индукцию мутаций в зародышевых линиях самцов мышей, подвергшихся воздействию различных мутагенов (ионизирующего излучения, алкилирующих агентов и противораковых препаратов).

Работая в Великобритании, Ю.Е. Дуброва сохранял рабочие и дружеские связи с российскими коллегами, с которыми он щедро делился с ними опытом и знаниями. Он часто бывал в ИОГен РАН и оставался активным участником ряда проектов, конференций, публикаций. В памяти коллег навсегда останется блестящая лекция Юрия Евгеньевича на конференции памяти Ю.П. Алтухова, состоявшейся в 2017 г. на Звенигородской биостанции МГУ.

Безвременная кончина Ю.Е. Дубровы — невосполнимая потеря для российской и мировой науки, для развития которой он еще так много мог бы сделать. А для коллег из ИОГен РАН — это еще и потеря доброго и отзывчивого товарища, души любой компании, веселого и остроумного человека.