

ISSN 0016-6758

Том 59, Номер 3

Март 2023



ГЕНЕТИКА



www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 59, номер 3, 2023

Обзорные и теоретические статьи

Неравная экспрессия родительских аллелей в плаценте человека

Е. А. Саженова, С. А. Васильев, И. Н. Лебедев 249

Эпигенетика кардиомиопатий: модификации гистонов и метилирование ДНК

А. Н. Кучер, М. С. Назаренко 266

Роль гена *АТОХ1* в метаболизме меди и в патогенезе медь-индуцированных заболеваний

И. Ж. Жалсанова, Е. А. Фонова, Д. И. Жигалина, Н. А. Скрыбин 283

Генетическая предрасположенность к кетозу у крупного рогатого скота: современное состояние

*О. В. Соколова, М. В. Бытов, А. И. Белоусов, Н. А. Безбородова,
В. Д. Зубарева, Н. А. Мартынов, О. С. Зайцева, И. А. Шкуратова* 294

Молекулярная генетика

Сайты связывания архитектурного белка Su(Hw) стимулируют рекрутирование эпигенетических регуляторов PcG/TxG на хроматин: CRISPR/Cas9-тест

М. М. Ерохин, Ф. В. Горбенко, Д. В. Ломаев, Д. А. Четверина 308

Генетика растений

Генетическое разнообразие можжевельника обыкновенного (*Juniperus communis* L.) в Евразии и на Аляске по данным анализа ядерных микросателлитов

Е. В. Хантемирова, В. А. Бессонова 316

Сравнительный анализ экспрессии генов *HAP2/GCSI*, *GEX2* у линий кукурузы саратовской селекции

Е. М. Моисеева, Ю. С. Гусев, О. В. Гуторова, М. И. Чумаков 327

Генетика животных

Анализ полиморфизма генов *ADCY8* и *RYS3* для установления принадлежности биологических образцов к диким или домашним представителям вида *Canis lupus*

В. Н. Кипень, М. М. Патрин, Е. В. Снытков, А. Н. Верчук, А. Н. Семак 336

Применение ДНК-штрихкодирования для изучения зеленых ящериц (Sauria: Lacertidae: *Lacerta*)

*М. А. Доронина, И. В. Доронин, С. А. Луконина,
Л. Ф. Мазанова, К. Ю. Лотиев, Н. Б. Ананьева* 345

Генетика человека

Полиморфизм 27 аутосомных STR-локусов у населения республики Беларусь
по данным массового параллельного секвенирования

*С. А. Котова, А. С. Парфёнова, Т. В. Забавская, В. И. Рыбакова,
Е. А. Спивак, С. А. Полевой, А. В. Луговнёв*

356

Contents

Vol. 59, No. 3, 2023

Reviews and Theoretical Articles

Biased Expression of Parental Alleles in the Human Placenta

E. A. Sazhenova, S. A. Vasilev, and I. N. Lebedev 249

Epigenetics of Cardiomyopathy: Histone Modifications and DNA Methylation

A. N. Kucher and M. S. Nazarenko 266

The *ATOX1* Gene Role in Copper Metabolism and in the Copper-Induced Diseases Pathogenesis

I. Zh. Zhalsanova, E. A. Fonova, D. I. Zhigalina, and N. A. Skryabin 283

Genetic Susceptibility to Ketosis in Cattle: Current State of Research

*O. V. Sokolova, M. V. Bytov, A. I. Belousov, N. A. Bezborodova,
V. D. Zubareva, N. A. Martynov, O. S. Zaitseva, and I. A. Shkuratova* 294

Molecular Genetics

Su(Hw) Architectural Protein Binding Sites Stimulate Recruitment of PcG/TrxG Epigenetic Regulators to Chromatin: CRISPR/Cas9-Test

M. M. Erokhin, F. V. Gorbenko, D. V. Lomaev, and D. A. Chetverina 308

Plant Genetics

Genetic Diversity of *Juniperus communis* L. in Eurasia and Alaska, Inferred from Nuclear Microsatellites Markers

E. V. Hantemirova and V. A. Bessonova 316

Comparative Analysis of the *HAP2/GCS1*, *GEX2* Genes Expression in Maize Lines of Saratov Selection

E. M. Moiseeva, Yu. S. Gusev, O. V. Gutorova, and M. I. Chumakov 327

Animal Genetics

Analysis of *ADCY8* и *RYR3* Genes Polymorphism for Identification Wild and Domestic Animal of Species *Canis lupus*

*V. N. Kipen, M. M. Patrin, E. V. Snytkov,
A. N. Viarchuk, and A. N. Semak* 336

Application of DNA Barcoding to the Study of Green Lizards (Sauria: Lacertidae: *Lacerta*)

*M. A. Doronina, I. V. Doronin, S. A. Lukonina,
L. F. Mazanaeva, K. Yu. Lotiev, and N. B. Ananjeva* 345

Variability of 27 Autosomal STR Loci for the Population of the Republic of Belarus Based on the Mass Parallel Sequencing Data

*S. A. Kotova, N. S. Parfionava, T. V. Zabauskaya, V. I. Rybakova,
A. A. Spivak, S. A. Paliavoi, and A. V. Lugovnev*

**ОБЗОРНЫЕ
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ**

УДК 577.218

**НЕРАВНАЯ ЭКСПРЕССИЯ РОДИТЕЛЬСКИХ
АЛЛЕЛЕЙ В ПЛАЦЕНТЕ ЧЕЛОВЕКА**

© 2023 г. Е. А. Саженова¹, *, С. А. Васильев¹, И. Н. Лебедев¹

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

*e-mail: elena.sazhenova@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 12.04.2022 г.

После доработки 17.08.2022 г.

Принята к публикации 02.09.2022 г.

Неравная экспрессия родительских аллелей играет основополагающую роль в формировании плаценты как многофункционального органа, необходимого для развития и выживания плода. В первую очередь это выражается в феномене импринтинга, когда в клетках плаценты экспрессируется только материнский или отцовский аллель. Плацента использует более широкий спектр механизмов импринтинга, чем эмбрион, — модификации гистонов, подавляющие или, наоборот, активирующие экспрессию рядом расположенных генов; регуляторные последовательности и гены, полученные от ретровирусов или ретротранспозонов; микроРНК, функционирующие как антисмысловые РНК и принимающие участие в транскрипционной и посттранскрипционной регуляции экспрессии генов. Кроме того, в плаценте обнаруживается неполное подавление активности одного из родительских аллелей, приводящее к смещенной импринтированной экспрессии некоторых генов. В настоящем обзоре показана роль неравной экспрессии родительских аллелей в развитии плацентарных структур эмбриона, обсуждены механизмы эпигенетического контроля родительских аллелей, преимущественно экспрессирующихся в плаценте.

Ключевые слова: геномный импринтинг, плацента, метилирование ДНК, модификации гистонов, импринтированные микроРНК, ретротранспозоны, смещение экспрессии импринтированных генов.

DOI: 10.31857/S001667582302011X, **EDN:** KYGICR

В геноме млекопитающих большинство генов имеют биаллельную экспрессию, характеризующуюся активностью обоих родительских гомологов. Примерно 10–15% аутосомных генов имеют случайную моноаллельную экспрессию, когда в каждой клетке или ткани равновероятно экспрессируется либо отцовский, либо материнский аллель [1]. Импринтированная моноаллельная экспрессия также приводит к активности только одного аллеля, но в данном случае активен всегда только один родительский аллель. Кроме того, для некоторых генов фиксируется смещенная импринтированная моноаллельная экспрессия, связанная с неполным подавлением транскрипции с одного из родительских аллелей [2]. Последние два механизма преимущественной экспрессии генов с одного из родительских аллелей могут быть инструментом в “битве полов” на поле раннего эмбрионального развития, связанной с реализацией различных эволюционных стратегий материнских и отцовских генов.

Геномный импринтинг играет ключевую роль в обеспечении нормального эмбрионального развития посредством влияния на уровень экспрес-

сии генов, контролирующих рост эмбриона, пролиферацию и дифференцировку клеток, другие процессы внутриутробного развития плода, плаценты, ЦНС и метаболизма у плацентарных животных [3]. Отличительной чертой импринтированных генов является экспрессия только с одного из родительских гомологов, обеспечивающая функциональную гаплоидизацию локусов. Известно около 200 импринтированных генов у мыши и 165 — у человека [3]. Около половины импринтированных генов кодируют факторы, вовлеченные в эмбриональное и неонатальное развитие, 20% — связаны с нейрологическими процессами, остальные остаются с невыясненной очевидной биологической функцией [4]. Таким образом, геномный импринтинг закрепился в двух основных направлениях — в регуляции эмбрионального и неонатального роста и в развитии головного мозга у млекопитающих.

Плацента является многофункциональным органом, необходимым для развития и выживания плода. Будучи связующим звеном между матерью и плодом, плацента играет важную роль в установлении и прогрессировании здоровой беремен-

ности, регулируя как рост плода, так и адаптацию матери к беременности. Метилирование ДНК долгое время считалось основным эпигенетическим механизмом геномного импринтинга у млекопитающих, обеспечивающим моноаллельную экспрессию родительских гомологов. Однако последние исследования раннего эмбрионального развития плацентарных млекопитающих, в том числе и человека, выявили альтернативные механизмы контроля экспрессии генов, в первую очередь характерные для плаценты и получившие название неканонического геномного импринтинга [5]. Было показано, что внезародышевые структуры используют более широкий спектр механизмов неканонического импринтинга, чем эмбрион: модификации гистонов, такие как H3K9me2, H3K9me3, H3K27me3, H2AK119ub, H3K9 и H4K20, подавляющие или, наоборот, активирующие экспрессию рядом расположенных генов; регуляторные последовательности и гены, полученные от ретровирусов или ретротранспозонов; микроРНК, функционирующие как антисмысловые РНК и принимающие участие в транскрипционной и посттранскрипционной регуляции экспрессии генов. Такой механизм неканонического импринтинга играет ключевую роль в развитии внезародышевых тканей, а также в регуляции инактивации импринтированной X-хромосомы мыши, подчеркивая важность унаследованных от родителей эпигенетических модификаций гистонов. Таким образом, канонический и неканонический импринтинг являются двумя различными эпигенетическими механизмами, регулирующими экспрессию генов.

В настоящем обзоре показана роль канонического и неканонического геномного импринтинга в развитии плацентарных структур эмбриона, обсуждены механизмы эпигенетического контроля неравной экспрессии родительских аллелей, преимущественно экспрессирующихся в плаценте.

РОЛЬ ПЛАЦЕНТЫ В РАЗВИТИИ ЭМБРИОНА

В плаценте человека существуют три основных типа клеток трофобласта: цитотрофобласт, вневорсинчатый цитотрофобласт и синцитиотрофобласт. Клетки цитотрофобласта представляют собой недифференцированную и пролиферирующую популяцию, они агрегируют в столбцы клеток на кончиках ворсинок, где дифференцируются в клетки вневорсинчатого цитотрофобласта – интерстициальные (концентрируются в децидуализированном эндометрии) и эндovasкулярные (проникают в спиральные артерии и реконструируют их) [6]. Цитотрофобласт непосредственно контактирует с материнской кровью и опосредует газообмен и питательные вещества. Синцитиотрофобласт состоит из многоядерных клеток, которые производят большое количество плацентарных гормонов для поддержания беременности. Все линии тро-

фобласта происходят из клеток трофэктодермы бластоцисты, и их скоординированная пролиферация и дифференцировка необходимы для успешной беременности. Нарушение развития и функций трофобласта приводит к различным осложнениям беременности, включая остановку или задержку внутриутробного развития, преэклампсию и т.д. [7]. Хотя плацента в основном состоит из зародышевых клеток, материнские иммунные и эндометриальные клетки также способствуют ее развитию и дифференцировке. Сигналы от плаценты модулируют рост и развитие плода, а также физиологию матери. Способность эмбриона влиять на организм матери у плацентарных млекопитающих создала возможность для появления геномного импринтинга, когда родительские аллели в геноме плода конкурируют за управление распределением материнских ресурсов.

Высокие материнские инвестиции в беременность и перинатальный период являются характерной чертой размножения плацентарных млекопитающих, приводя к увеличению выживаемости потомства. Эволюционная плата матери больше по сравнению с отцом, так как если потомок окажется нежизнеспособным, то мать потратит ресурсы и даже рискует погибнуть. Матротрофия через плаценту позволяет матери прерывать эмбрионы низкого качества преимущественно на ранних сроках беременности с целью снижения рисков и ресурсов в нежизнеспособное потомство. Отцу в большей степени выгодно развитие плаценты как способа обеспечения влияния своих генов на развитие эмбриона. В этой логике эмбрион должен получить как можно больше ресурсов, даже ценою больших потерь матери. Так, увеличение плаценты и массы плода может обеспечить преимущественное размножение потомков по линии отца, но при этом истощит ресурсы матери. Поэтому именно в плаценте преобладают гены с отцовской экспрессией, а некоторые способны контролировать экспрессию других генов, создавая импринтированную генную сеть, которая влияет на развитие плаценты и плода. Например, у мыши ген *Zac1(Plagl1)* с экспрессией только с отцовского аллеля является фактором транскрипции с доменом цинковых пальцев, который индуцирует апоптоз и остановку клеточного цикла. *Zac1* способен связываться с *H19/Igf2* и изменять его экспрессию, а также изменять экспрессию *Cdkn1c* и *Dlk1* [8]. Гены *H19* и *Cdkn1c* являются отрицательными регуляторами пролиферации клеток, *Igf2* и *Dlk1* отвечают за рост, развитие плода и дифференцировку клеток. Таким образом, *Zac1* координирует регуляцию сразу нескольких генов, контролирующих важные функции эмбриогенеза [9].

Если отцу выгодно развитие плаценты, то должны быть механизмы, которые обеспечивают селективную работу в ней отцовских генов. Одним

из таких механизмов является геномный импринтинг с экспрессией только одного из аллелей. Действительно, более 50% известных импринтированных генов у человека преимущественно экспрессируются с отцовских аллелей. Целью такого импринтинга может быть подавление экспрессии материнских генов, препятствующих развитию нежизнеспособного эмбриона и экспрессии отцовских генов, способствующих имплантации и обеспечению эмбриона материнскими ресурсами.

Отражением специфической программы развития плаценты является ее более гипометилированный геном по сравнению с эмбрионом. Это достигается низкой импринтированной экспрессией, поддерживающей метилтрансферазы *DNMT1* с отцовского аллеля, позволяющей экспрессироваться генам с других, например вирусных или ретротранспозонных промоторов, которые обычно подавлены метилированием. Таким образом, гипометилирование плаценты, а значит и весь эпигенетический ландшафт для контроля за программой развития, контролируется отцовским геномом [10]. Кроме того, первые этапы дифференцировки клеток трофобласта находятся под влиянием транскрипционного фактора *GATA3* с импринтированной экспрессией только с отцовского аллеля [11]. *GATA3* начинает экспрессироваться уже на третьем делении зиготы и клетки с высокой экспрессией этого фактора формируют трофобласту.

Таким образом, материнский и отцовский геномы конкурируют за право регуляции роста и развития плода. Отцовские импринтируемые экспрессируемые аллели, как правило, стимулируют рост эмбриона, максимизируя конкурентоспособность индивидуального потомка, имеющего конкретный отцовский геном. Материнские импринтированные гены, наоборот, подавляют рост плода, чтобы распределить материнские ресурсы между большим числом потомков, которые могут иметь разные отцовские геномы.

ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОВ, ИМПРИНТИРОВАННЫХ В ПЛАЦЕНТЕ

У мыши обнаружены гены и генные кластеры, импринтированная экспрессия которых присутствует только в плацентарных тканях (табл. 1, рис. 1). В основном это белок-кодирующие гены и участки генома, транскрибирующие длинную некодирующую РНК с неканоническим импринтингом, в основе которого лежит H3K27me3 [10]. В первую очередь это гены, которые отвечают за функционирование плаценты. В частности, продукт гена *GAB1* в плаценте участвует в передаче сигналов факторов роста и цитокинов, к которым чувствителен синцитиотрофобласт. Нарушение работы этого гена приводит к дефектному образованию синцитиотрофобласта и ухудшает перенос питательных веществ между матерью и плодом и,

следовательно, связано с ограничением роста плода [12]. Ген *Sfmbt2* необходим для поддержания плюрипотентности стволовых клеток трофобласта [13]. Делеция экспрессирующегося аллеля этого гена приводит к эмбриональной летальности из-за аберрантного развития внезародышевых тканей. Также это гены, функция которых связана с регуляцией активности других генов. Так, гены *Sall1* и *Sfmbt2* являются репрессорами, которые ингибируют экспрессию одного или нескольких генов путем связывания с оператором или сайленсером, а *Kif14* — корепрессором, который не связывается непосредственно с ДНК, а косвенно регулирует экспрессию генов, связываясь с репрессором [14]. Белок JADE1 участвует в ацетилировании H4 и активации транскрипции.

Как правило, импринтированные гены располагаются на хромосомах в виде кластеров. Например, на хромосомах 7 и 17 мыши расположены два кластера импринтированных генов: *Kcnqlot1/Kcnq1*, экспрессирующийся с прямой “+” цепи ДНК, и *Airn/Igf2r* (рис. 1), экспрессирующийся исключительно в плаценте [10].

Механизм инактивации генов внутри кластера часто построен на экспрессии длинных некодирующих РНК. Каждый из импринтированных кластеров содержит герминативный центр импринтинга (ЦИ) на материнском гомологе, который непосредственно подавляет экспрессию длинных некодирующих РНК (lncRNA) (*Kcnqlot1* и *Airn*), экспрессирующихся только с отцовского аллеля. В свою очередь, экспрессия отцовских РНК *Kcnqlot1* и *Airn* действует на то, чтобы выключить перекрывающиеся антисмысловые (*Kcnq1* и *Igf2r* соответственно) и дистальные белок-кодирующие гены в *цис*-положении, подавляя экспрессию на протяжении 7.7 Мб, выключая отцовский аллель (рис. 1) [15]. Подавление экспрессии на одном из аллелей в этих кластерах происходит за счет связывания lncRNA с белками группы поликомб (PRC1 и PRC2), что приводит к метилированию H3K27me3 на отцовском гомологе *цис*-положении и сворачиванию дистальных областей в непосредственной близости от транскрибируемой lncRNA на отцовском аллеле [16]. Все это приводит к плацентарно-специфической импринтированной экспрессии только с материнского гомолога 14 генов *Kcnqlot1/Kcnq1* и 12 генов *Airn/Igf2r* кластеров. Используя мышинные модели нокаута гена *Phlda2*, входящего в кластер *Kcnqlot1/Kcnq1*, показано, что он необходим для правильного формирования спонгиозотрофобласта, который способствует прорастанию материнских сосудов в плаценту, продуцируя ряд специфических молекул, в том числе ангиогенных факторов. Спонгиозотрофобласт образует гликогенные клетки, количество которых увеличивается до эмбриональной стадии E16.5 мыши. Они внедряются в материнскую децидуальную ткань и являются дополнительным

Таблица 1. Неканонически импринтированные гены в плаценте мыши

Ген	Локализация		Функция гена
	мышь	человек	
<i>Zbdf2/Liz</i>	1C2	2q33.3	Белок, содержащий домены цинкового пальца DBF4-типа, альтернативный сплайсинг приводит к множественным вариантам транскрипта
<i>Gm13261</i>	2A1	—	Неизвестна
<i>Sfmbt2</i>	2A1	10p14	Транскрипционный корепрессор, ген группы поликомб необходим для поддержания трофобласта и развития плаценты
<i>Zfp64</i>	2H3	20q13.2	Белок участвует в регуляции продукции цитокинов и регуляции транскрипции РНК-полимеразы II
<i>Jade1 (Phf17)</i>	3B	4q28.2	Белок участвует в ацетилировании гистонов и регуляции сигнального пути, регулирующего эмбриогенез, дифференцировку клеток и развитие злокачественных опухолей
<i>Tfpi2</i>	6A1	7q21.3	Член семейства ингибиторов сериновых протеаз, ген-супрессор опухоли при нескольких типах рака, альтернативный сплайсинг приводит к множественным вариантам транскрипта
<i>Ppp1r9a</i>	6A1	7q21.3	Регуляторная субъединица фосфатазы белка I и контролирует реорганизацию актинового цитоскелета, имеет альтернативно сплайсированные варианты транскрипта, кодирующие различные изоформы
<i>Pon3</i>	6A1	—	Параоксоназа, предотвращает окисление липопротеинов, уменьшает образование липидных пероксидов
<i>Kif14</i>	6A3.3	7q32.2	Белок функционирует как транскрипционный корепрессор и индуцируется трансформирующим фактором роста (TGF-beta) для подавления экспрессии гена рецептора II TGF-beta
<i>Gab1</i>	8C2	4q31.21	Белок необходим для развития плаценты, у <i>Gab1</i> $-/-$ эмбрионов в плаценте нарушено развитие синцитиотрофобласта, что ухудшает перенос питательных веществ между матерью и плодом и связано с ограничением роста плода
<i>Sall1</i>	8C3	16q12.1	Репрессор транскрипции цинкового пальца, часть комплекса гистондеацетилазы NuRD
<i>Platr20</i>	11B1.3	—	Длинная некодирующая РНК
<i>Smoc1</i>	12D1	14q24.2	Секретируемый белок, играет роль в развитии глаз и конечностей, альтернативный сплайсинг приводит к множественным вариантам транскрипта
<i>Slc38a4</i>	15F1	12q13.11	Трансмембранный переносчик аминокислот
<i>Pnlcd1</i>	17A1	6q25.3	Белок участвует в ядерно-транскрибируемом укорочении хвоста мРНК поли(A). Вовлечен в сперматогенную недостаточность
<i>Xist</i>	XD	Xq13.2	Длинная некодирующая РНК, связана с инактивацией одной из X-хромосом у самок, обеспечивая эквивалентность дозы между самцами и самками. Этот ген экспрессируется из центра инактивации неактивной X-хромосомы, транскрипт представляет собой сплайсированную РНК

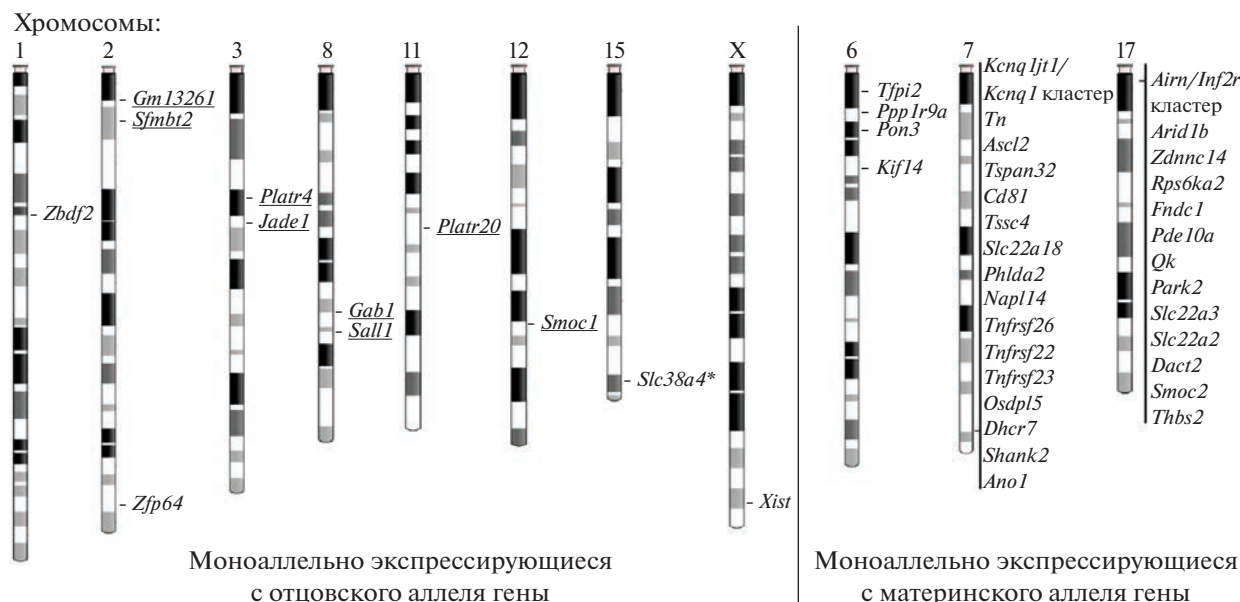


Рис. 1. Внезародышевые специфичные импринтированные гены в геноме мыши. Подчеркнуты гены, которые неканонически импринтированы; звездочкой отмечен ген, который импринтируется каноническим импринтингом в тканях эмбриона и неканоническим — во внезародышевой мезодерме.

источником питания плода. Подавление экспрессии *Phlda2* приводит к задержке роста плода [10].

Таким образом, в плаценте экспрессируются гены с неканоническим геномным импринтингом, в основе экспрессии которых лежит не только метилирование ДНК, но и модификации гистонов, такие как H3K27me3, функции которых связаны с регуляцией транскрипции, эпигенетической регуляцией клеточной дифференцировки, ростом и развитием плаценты.

РОЛЬ ИМПРИНТИРОВАННЫХ микроРНК

Помимо белок-кодирующих генов, в плаценте часто импринтированы гены регуляторных РНК, в том числе микроРНК (миРНК). МикроРНК — малые некодирующие молекулы РНК длиной 19–21 нуклеотидов. Большинство из них функционируют как антисмысловые РНК, часто расположенные в 3'-нетранслируемых областях (3'-UTR) мРНК [17]. МикроРНК млекопитающих играют регуляторную роль во многих аспектах развития и функций плаценты, от инвазии клеток трофобласта до иммунитета через ангиогенез [18].

У млекопитающих экспрессия многих генов, кодирующих миРНК, регулируется геномным импринтингом. Подавляющее большинство импринтированных генов микроРНК локализованы в трех импринтированных доменах: DLK1-DIO3 (14q32, кластер C14MC), содержащий 52 гена, экспрессирующихся только с материнского гомолога; кластер C19MC (19q13.4) — 46 генов с отцовской экспрессией; специфичный для грызунов C2MC, рас-

положенный в интроне 10 гена *Sfmbt2*, с отцовской экспрессией. МикроРНК кластеров C14MC и C19MC специфичны для плацентарных млекопитающих, в том числе и человека. Эти импринтированные гены микроРНК образуют большие домены, состоящие из многих родственных копий генов, которые коэкспрессируются исключительно в плаценте [19].

Специфичные для плацентарных млекопитающих с материнской экспрессией гены микроРНК кластера C14MC, расположенные в импринтированном домене DLK1-DIO3, играют важную роль в пренатальном росте, плацентации, скелетном и мышечном развитии, постнатальном метаболизме и функциях мозга [2]. Этот регион (14q32 у человека, дистальная область хромосомы 12 у мыши) протяженностью ~1 млн пн включает экспрессирующиеся с отцовского гомолога белок-кодирующие гены (*DLK1*, *RTL1*, *MEG8* и *DIO3*) и экспрессирующиеся с материнского гомолога некодирующие транскрипты РНК, включая *MEG3*, антисмысловой транскрипт *RTL1*, малые ядрышковые РНК, принадлежащие к семействам SNORD, а также многочисленные микроРНК. У человека микроРНК кластера C14MC сгруппированы в двух регионах: miR-127/miR-136 и miR-379-miR-410, расположенных вокруг кластера SNORD [20].

Кластер miR-127/miR-136 мыши регулирует капилляры плода в зоне лабиринта. Отцовский экспрессирующийся ген *Rtl1* (*Peg11* или *SIRH2*) представляет собой ретротранспозон типа Ty3/Gypsy и имеет консервативную открытую рамку считывания, лишенную длинных концевых повторов.

Эволюционно этот ген ретротранспозировался в область *Dlk1-Dio3* до разделения плацентарных и сумчатых, но закрепился только у плацентарных [21]. *Rtl1* связан с матерински экспрессируемым антисмысловым транскриптом (*anti-Rtl1*), который также служит первичным транскриптом для кластера *miR-127/miR-136*. У мыши *anti-Rtl1* генерирует шесть миРНК: *miR-431*, *miR-433*, *miR-127*, *miR-434*, *miR-432*, *miR-136*. Благодаря своей организации эти миРНК полностью комплементарны последовательностям мРНК *Rtl1* и таким образом способны расщеплять мРНК *Rtl1* через РНК-интерференцию. Отцовская делеция *Rtl1* приводит к поздней фетальной и неонатальной летальности, сопровождавшейся пре- и постнатальной задержкой роста эмбриона и плаценты за счет расщепления базальной мембраны трофобласта и закупорки капилляров плода. Делеция этого гена на материнском гомологе также сопровождается неонатальной летальностью за счет плацентомегалии [22].

Хромосомный домен *C19MC* был впервые описан Bentwich (2005) [23]. Этот специфичный для приматов кластер состоит из 46 генов миРНК и занимает область длиной ~100 тпн перед кластером *miR-371/miR-373*. Многие, если не все, миРНК *C19MC*, по-видимому, реплицируются из интронов транскрипта *C19MC-HG*, состоящего из множества повторяющихся некодирующих экзонов. *C19MC* сильно обогащен элементами *Alu*, которые, весьма вероятно, способствовали эволюции и росту *C19MC* [19].

Гены *C19MC* преимущественно экспрессируются в плаценте, а также в недифференцированных эмбриональных стволовых и половых клетках. Примечательно, что миРНК *C19MC* являются одними из наиболее распространенных миРНК, экспрессирующихся в клетках трофобласта человека [24]. Кластер *C19MC* активен только на отцовском гомологе и перекрывает дифференциально метилированную область, которая приобретает метилирование ДНК в ооците [25]. Таким образом, этот дифференциально метилированный регион (ДМР) может функционировать как центр импринтинга, который контролирует моноаллельную экспрессию не только в *C19MC*, но и, возможно, во фланкирующем импринтированном гене с экспрессией материнского аллеля *ZNF331* [25] и в отцовски экспрессируемом кластере *miR-371/miR-373* [26].

МикроРНК кластеров *C14MC* и *C19MC* во время развития плаценты человека регулируются пространственно-временным образом. *C19MC* высоко экспрессируется на ранних сроках беременности, потенциально точно настраивая дозозависимым образом уровень экспрессии генов, которые участвуют в глубокой внутриутробной инвазии трофобластов и ремоделировании спиральных артерий матки на границе раздела мать—плод,

обеспечивая уникальный тесный контакт между материнскими и фетальными кровотоками [20]. Однако уровни экспрессии могут варьировать от одной микроРНК к другой. Экспрессия *C19MC* также была зарегистрирована в мезенхимальных стромальных клетках плаценты, что указывает на то, что регуляторные функции *C19MC* могут не ограничиваться трофобластом [26]. В отличие от *C19MC* экспрессия *C14MC* снижается в плаценте с первого по третий триместр беременности [27]. Кроме того, aberrантная экспрессия миРНК в целом и миРНК *C19MC* в частности часто обнаруживается при различных осложнениях беременности, включая преэклампсию, ограничение внутриутробного роста или преждевременные роды [28]. Исследование первичных культур трофобласта подтверждает участие одного или нескольких миРНК кластера *C19MC* в физиологии трофобласта. Так, экспрессия *miR-515* значительно снижается при дифференцировке цитотрофобласта в синцитиотрофобласт и, наоборот, сверхэкспрессия *miR-515-5p* подавляет дифференцировку синцитиотрофобласта. миРНК кластера *C19MC* также модулируют миграцию и инвазию вневорсинчатотрофобласта, в частности через влияние *miR-519d-3p*, *miR-520g*, *miR-517a/b* и *miR-520c-3p* [19]. Также кластер *C19MC* участвует в метаболизме плаценты через адаптацию к гипоксии. Гипоксический стресс связан со снижением уровней *miR-520c-3p*, в то время как уровни экспрессии других миРНК *C19MC* остаются неизменными. Также *miR-517-3p*, *miR-516-5p* и *miR-512-3* участвуют в устойчивости к вирусной инфекции, включая цитомегаловирус человека, вирус везикулярно-стоматита, вирус простого герпеса-1, вирус коревой оспы, полиомиелита и др. Было показано, что эти миРНК упаковываются в экзосомы, доставляются в кровотоки и инкорпорируются клетками-реципиентами материнского или фетального происхождения, где они вызывают противовирусный ответ через аутофагию [29, 30].

Характерный для грызунов домен *C2MC* включает ген с отцовской импринтированной экспрессией *Sfmbt2*. В 10-м интроне этого локуса содержится большой кластер генов микроРНК, образованный tandemной дубликацией базовой единицы, состоящей из повторяющихся ретротранспозонов *B1*. *Sfmbt2* является регулятором трофобласта. Гомозиготные мутантные мыши с делецией всего гена имели слабо развитую зону соединения плаценты, ограничение роста плода и высокие показатели гибели плода [31].

Таким образом, целые кластеры миРНК в плаценте экспрессируются только с одного из родительских аллелей. Учитывая роль различных миРНК как регуляторов транскрипции генов, это еще раз указывает на роль импринтинга как механизма приобретения родительскими аллелями

контроля за генными сетями и разворачиванием программы индивидуального развития в плаценте.

РОЛЬ ГЕНОМНОГО ИМПРИНТИНГА В РАННЕМ ЭМБРИОГЕНЕЗЕ

Эпигенетическое репрограммирование ДНК имеет решающее значение для установления и поддержания импринтинга как во время развития зародышевых клеток, так и в преимплантационный период. Метилирование ДНК заключается в присоединении метильной группы к цитозину в составе CpG-динуклеотида в позиции C5 цитозинового кольца. Метилирование в промоторной зоне гена, как правило, приводит к подавлению его экспрессии.

Стирание метилирования генома происходит в первичных половых клетках и восстанавливается во время гаметогенеза путем дифференциального метилирования *de novo* с участием ДНК метилтрансферазы 3А (*DNMT3A*) и каталитически неактивного кофактора *DNMT3L*, который стимулирует *DNMT3A* и необходим для создания метилирования на родительском гомологе. *DNMT* связывается с метилированными CpG, которые транскрипционно активны и обогащены триметилированием H3-лизина-36 (H3K36me3), но лишены метилирования H3-лизина-4 [32]. В оогенезе метилирование ДНК происходит в промоторных участках транскрибируемых генов, тогда как в сперматогенезе большая часть генома метилируется вне регуляторных элементов и CpG-островков [33]. Существует несколько тысяч CpG-островков, которые дифференциально метилированы между ооцитами и сперматозоидами, однако подавляющее большинство из них теряет дифференциальное метилирование во время эпигенетического перепрограммирования в раннем эмбриогенезе [34]. Другая волна репрограммирования происходит сразу после оплодотворения. В это время материнский и отцовский геномы подвергаются деметилированию, за исключением импринтированных генов. Деметилирование отцовского пронуклеуса происходит путем TET3-опосредованного окисления 5-метилцитозина (5mC) в 5-гидроксиметилцитозин, приводит к неметилированному цитозину, которое завершается до первой репликации ДНК, в то время как материнские гомологи деметилируются по пассивному механизму, зависящему от репликации ДНК, до стадии бластоцисты, где присутствует лишь небольшая часть геномного метилирования. В отличие от остального генома импринтированные герминативные дифференциально метилированные регионы (ДМР) защищены от такого стирания путем формирования комплекса ZFP57/TRIM28, с помощью которого обеспечивается доставка ядерного белка DNMT1 в регионы импринтируемых генов, что гарантирует устойчивость метилирова-

ния при репрограммировании. В эмбриональных стволовых клетках ZFP57 распознает метилированный CpG-содержащий мотив и рекрутирует комплекс, содержащий TRIM28, что привлекает H3K9 (гистон 3 по лизину 9) метилтрансферазу SETDB1 — это обеспечивает дополнительный контроль метилирования ДНК [35].

После того как бластоциста имплантируется в матку и иницируется гастрюляция, происходит повторное *de novo* метилирование ДНК с участием *DNMT3A* и *DNMT3B* по всему геному, в результате которого геном в эмбриональных тканях становится гиперметилированным, тогда как внезародышевые ткани поддерживают частично метилированное состояние [36]. Несмотря на эти глобальные различия, импринтированные герминативные ДМР сохраняют свой аллель-специфический рисунок метилирования ДНК в обеих линиях посредством защиты неметилированного аллеля. В тоже время некоторые импринтированные гены приобретают различия в ДМР между эмбриональными и внезародышевыми линиями (рис. 1) [37].

Нарушение экспрессии генов, участвующих в поддержании или установлении импринтированного характера метилирования в ДМР, приводит к частичному или полному гипометилированию в одном или нескольких импринтированных генах.

Таким образом, рисунки метилирования ДНК в процессе волн эпигенетического перепрограммирования импринтированных локусов стираются в примордиальных половых клетках, вновь устанавливаются в течение гаметогенеза, поддерживаются во время второй волны эпигенетического перепрограммирования сразу после оплодотворения и остаются стабильными в течение всей жизни организма.

ГЕНОМНЫЙ ИМПРИНТИНГ И МОДИФИКАЦИИ ГИСТОНОВ В ПЛАЦЕНТЕ

Многие гены имеют импринтированный характер экспрессии во всех тканях, хотя их наиболее критичные функции в первую очередь осуществляются в плаценте. Однако некоторые гены импринтированы только в тканях плаценты. Одним из механизмов моноаллельной экспрессии импринтированных генов в плаценте является подавление экспрессии одного из аллелей посредством метилирования гистона H3 по лизину в позиции 27 (H3K27me3). Гистоновый белок H3 входит в состав нуклеосомы, которая является основной единицей хроматина, содержащей ДНК, намотанную вокруг белков октамера. Эти основные гистоны богаты остатками лизина и аргинина. Каждый из этих белков имеет удлиненные хвосты, которые являются мишенями модификации нуклеосом путем

метиляции и других посттрансляционных модификаций. Частые сайты метилирования гистонов, связанные с инактивацией гена, включают модификации H3K9me2, H3K9me3, H3K27me3 и H2AK119ub, которые ассоциированы с репрессией транскрипции посредством образования гетерохроматиновых областей [5]. Напротив, монометилирование H3K27, H3K9 и H4K20 может активировать экспрессию генов [38]. Метилирование гистоновых хвостов служит маркером для привлечения различных белковых комплексов, которые необходимы для регуляции активации или инактивации хроматина, а также для процессов репарации ДНК. Так, H3K9me3 привлекает ферменты репарации к местам двуцепочечных разрывов ДНК [5].

Как правило, для метилирования остатка лизина требуется специфическая гистонметилтрансфераза (HMT), содержащая эволюционно консервативный домен SET, а также поликомб репрессивный комплекс (PRC) — PRC2, который опосредует триметилирование гистона 3 по лизину 27 за счет активности гистонметилтрансферазы. Эта метка может рекрутировать PRC1, который связывается с хвостом H3 и способствует уплотнению хроматина [39]. Белки группы поликомб представляют собой семейство эпигенетических регуляторов, которые, модифицируя гистоны, подавляют активность многих генов. Связываясь с хроматином, белки группы поликомб вызывают локальные и глобальные изменения в хромосомной конформации, регулируя организацию генов-мишеней в трехмерном пространстве ядра. Влияя на 3D-архитектуру генома, они видоизменяют структуру хроматина так, что транскрипционные факторы не могут связываться с промоторными последовательностями ДНК [40].

У млекопитающих различают две основные группы, содержащие комплексы белков группы поликомб, — это ингибиторные комплексы PRC1 и PRC2, экспрессия которых имеет большое значение в развитии зародыша мыши. Нокаут по обоим копиям гена *PRC2* во время гаметогенеза сперматозоидов приводит к остановке мейоза и прогрессирующей потере сперматозоидов, в растущих яйцеклетках вызывает серьезное ограничение роста, приводящее к гибели на стадии зародыша, в то время как нокауты по гену *PRC1* являются гомеозисными мутантами и погибают после рождения [41].

Комплекс PRC1 подавляет экспрессию генов, переводя хроматин в компактную форму — гетерохроматин: с помощью субъединицы CBX он связывает “метку репрессии” и гистон H3K27me3 в составе нуклеосомы, затем субъединица Bmi1 связывает нуклеосомы через комплекс транскрипционных факторов Runx1/CBFβ. Также субъединица RING1 этого белка способна осуществлять моно-

убиквитинирование гистона H2A с образованием H2A K119ub, а субъединица CBX7 — связывать длинные некодирующие РНК с промоторными областями, что приводит к подавлению экспрессии соответствующих генов [38].

H3K27me3 также часто взаимодействует с H3K4me3 в двухвалентных доменах с участием комплекса PRC2, что вызывает репрессию транскрипции путем метилирования гистонов и негистоновых белков. Комплекс PRC2 представляет собой динамический комплекс, состоящий из четырех основных субъединиц: каталитической субъединицы EZH1/2, SUZ12, EED и RbAp46/48. EZH2 катализирует триметилирование гистона H3 лизина 27 до H3K27me3 — транскрипционно-репрессивной эпигенетической метки [42]. Для его посадки на ген-мишень необходима метка активного хроматина H3K4me3 (в образовании которой важную роль играют белки группы Trithorax) и специальная некодирующая РНК, связывающая субъединицу SUZ12. Эти домены обычно находятся в эмбриональных стволовых клетках и являются ключевыми для правильной клеточной дифференцировки. H3K27me3 и H3K4me3 определяют будет ли клетка дифференцироваться.

Сперматозоиды и яйцеклетки образуются из первичных половых клеток в результате различных процессов. Следовательно, их геномы упакованы по-разному с различными эпигенетическими ландшафтами. Так, в растущих ооцитах мыши модификация H3K27me3 происходит в основном в дистальных неканонических областях и лишь в редких случаях в промоторах генов [43]. Генетическое вмешательство в функцию PRC2 в растущих ооцитах не предотвращает их созревание, но связано с фенотипом постнатального избыточного роста в потомстве [44]. В полностью созревших яйцеклетках и яйцеклетках метафазы II уровень H3K27me3 снижается, но тем не менее он все еще присутствует в этих регионах. Домены H3K27me3 в ооцитах мыши на поздней стадии плотно упакованы и связаны с белками комплекса поликомб.

H3K27me3 совпадает с моно-убиквитинированием гистона H2A по лизину 119 (H2AK119ub) с участием PRC1. Во время роста яйцеклеток мыши устанавливаются атипичные широкие домены H2AK119ub, которые демонстрируют сильное перекрытие с H3K27me3. Однако хотя H2AK119ub и H3K27me3 локализируются в яйцеклетках мыши, они демонстрируют различную динамику перепрограммирования после оплодотворения, поскольку аллель-специфичность H2AK119ub выравнивается на двухклеточной стадии. После образования диплоидной зиготы H3K27me3 отсутствует в канонических промоторных регионах, в то время как дистальные участки ДНК все еще имеют модификацию H3K27me3 на материнском гомологе, которая сохраняется до образования мору-

лы [45]. Кроме того, H3K27me3 перекрывается с H3K9me3 и совместно участвует в подавлении экспрессии материнского аллеля, по крайней мере на уровне зиготы [31]. Все это приводит к импринтированной экспрессии генов только с отцовского аллеля. Важно отметить, что у этих генов отсутствуют дифференциально метилированные области зародышевой линии, что подчеркивает роль H3K27me3 в качестве независимого от метилирования ДНК медиатора геномного импринтинга [5].

После стадии морулы эмбриональные стволовые клетки распределяются во внутреннюю клеточную массу (ВКМ), из которой будут развиваться соматические ткани эмбриона, или в трофобласту, которая состоит из предшественников внезародышевых линий, включая внезародышевую эктодерму. Клетки ВКМ демонстрируют снижение экспрессии импринтированных генов на отцовском гомологе, начиная со стадии бластоцисты у мыши (стадия E3.5) и до стадии морулы (E4.5) [31]. Постимплантационный переход ВКМ в плюрипотентные стволовые клетки эпибласта сопровождается глобальным перераспределением H3K27me3: в эпибласте происходит потеря H3K27me3 на материнском аллеле, что приводит к выравниванию экспрессии генов обоих родительских аллелей, точно так же большинство генов теряют свой импринтинг во внезародышевых линиях после имплантации эмбриона мыши, однако некоторые гены экспрессируются исключительно с отцовского гомолога во внезародышевой и висцеральной энтодерме (рис. 1). Это гены, экспрессия которых поддерживается неканоническим импринтингом, осуществляемым посредством H3K27me3.

Важным является вопрос о том, какие (эпигенетические признаки отличают гены с неканоническим импринтингом, которые теряют импринтинг во внезародышевых линиях. Оказалось, что эти гены имеют модификацию H3K4me3. Триметилирование H3K4 регулирует экспрессию генов посредством ремоделирования хроматина комплексом NURF. В этих генах соматические ДМР экспрессируются только с отцовского гомолога во внезародышевой эктодерме, в то время как в эмбриональных тканях они имеют биаллельную репрессию [46]. Установление соматических ДМР, связанных с этими генами, зависит как от материнского H3K27me3, так и от отцовского H3K4me3: ДНК-метилирование материнских аллелей, меченных H3K27me3, устанавливается метилтрансферазами DNMT3a/3b *de novo*, а отцовские аллели маркируются H3K4me3, которые отталкивают ДНК-метилтрансферазы, нарушая взаимодействие между ними и N-концевым хвостом гистона H3, и поэтому остаются защищенными от метилирования ДНК *de novo* [47]. Кроме того, эти гены маркированы эндогенными ретровирусны-

ми вставками с длинными концевыми повторами (LTR), которые действуют как альтернативные промоторы во внезародышевых тканях. Такие альтернативные промоторы обнаружены для генов, кодирующих белки — *Gab1* и *Smoc1* [5]. Еще один неканонически импринтированный ген *Slc38a4* имеет моноаллельную экспрессию как в эмбриональной, так и во внезародышевых линиях на стадии имплантации. Этот ген канонически импринтирован в эмбриональных линиях и экспрессируется моноаллельно с отцовского гомолога *Slc38a4*, в то время как неканонический H3K27me3-зависимый импринтинг лежит в основе моноаллельной экспрессии во внезародышевых тканях [46]. У человека также показано, что некоторые гены, независимо от метилирования ДНК, имеют домены H3K27me3 в промоторных регионах и подвергаются H3K27me3 на материнском аллеле, по крайней мере на стадии морулы. Это гены *DUSP4* (8p12), *EDNRB* (13q22.3), *ERO1LB* (1q43), *FAM101A* (22q12.2) и *MAGEB2* (Xp21.2), которые экспрессируются исключительно с отцовского аллеля [48]. Например, ген *FAM101A* участвует в развитии скелета, *ERO1LB* — в сворачивании белка в эндоплазматическом ретикулуме путем окисления фермента P4HB/PDI, катализирующего образование дисульфида белка.

Таким образом, неканонический импринтинг, характерный для плаценты млекопитающих, устанавливающийся на стадии материнского промотора, поднимает вопрос о возможном влиянии отцовских генов на этот процесс с целью организации преимущественной экспрессии отцовских аллелей. Неканонический импринтинг использует более широкий спектр механизмов эпигенетического контроля, в отличие от классического геномного импринтинга, базирующегося на метилировании цитозинового остатка в составе CpG-динуклеотидов. В эти механизмы входят: модификации гистонов, такие как H3K9me3, H3K27me3, H2AK119ub и H3K9, подавляющие или, наоборот, активирующие экспрессию рядом расположенных генов; регуляторные последовательности и гены, полученные от ретровирусов или ретротранспозонов; микроРНК, функционирующие как антисмысловые РНК, принимающие участие в транскрипционной и посттранскрипционной регуляции экспрессии генов.

ГЕНОМНЫЙ ИМПРИНТИНГ В ПЛАЦЕНТЕ, РОЛЬ РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ

Роль ретровирусов и ретротранспозонов в эволюции плацтации и функционировании плаценты является предметом активного обсуждения [49–51]. Такой интерес связан с тем, что многие ключевые процессы в развитии плаценты зависят от механизмов с участием регуляторных последовательностей и генов, полученных от ре-

тровирусов или ретротранспозонов. Так, некоторые гены, необходимые для развития плаценты, получены от ретровирусов, которые составляют до 5–8% генома человека. В первую очередь это гены синцитин 1 (*ERVW-1*) и синцитин 2 (*ERVFRD1*), полученные от эндогенных ретровирусов человека HERV. Они обеспечивают слияние клеток трофобласта с образованием синцитиотрофобласта, внешнего слоя дифференцированного трофобласта в ворсинах хориона, а также участвуют в плацентарной защите от отторжения плода материнской иммунной системой [52]. Еще один ген, полученный от HERV, — ген белка супрессина [53]. Этот белок блокирует работу синцитина 1, но не синцитина 2, и ингибирует межклеточное слияние с образованием синцития. Под его действием клетки трофобласта дифференцируются в неворсинчатый трофобласт и мигрируют к спиральным артериям матери, замещают собой эндотелий этих артерий и обеспечивают их ремоделирование [54]. Таким образом, два гена, управляющие ключевыми этапами дифференцировки трофобласта, имеют ретровирусное происхождение.

В эволюции млекопитающих первыми импринтированными генами стали бывшие вирусные гены — *Ins*, *Mest*, *Peg10*, *Igf2*, *Igf2r* и *H19* [55], которые геном млекопитающих смог подчинить себе. Импринтированные гены *PEG10* и *RTL1* (*PEG11*), экспрессирующиеся с отцовского аллеля и необходимые для развития плаценты, были заимствованы путем горизонтального переноса сумчатыми млекопитающими у LTR-ретротранспозона Sushi-ichi, относящегося к семейству Ty3/Gypsy. *Peg10* играет существенную роль в дифференцировке клеток трофобласта в спонгиозотрофобластном и лабиринтном слоях [56]. Делеция этого гена приводит к ранней эмбриональной летальности у мышей в связи с отсутствием в плаценте спонгиозотрофобластных и лабиринтных слоев [57]. Нокаут *Peg11* приводит к фетальной летальности у мышей в связи с тяжелыми дефектами капилляров в лабиринтном слое плаценты.

Многие импринтированные гены, экспрессирующиеся в плаценте, имеют ретровирусную вставку в промоторы, которая в трофобласте плаценты функционирует как энхансер через связывание факторов транскрипции с промоторами генов *CYP19*, *Endothelin B receptor*, *INSL4*, *Leptin*, *MID1* (*Midline1*), *Pleiotrophin* и др. [58]. Так, видоспецифические ERV эпигенетически регулируют специфические для мыши и человека импринтированные гены во внезародышевых тканях мыши [4, 46]. В отличие от ERVK LTR по всему геному, в плаценте они имеют относительно высокое содержание CpG и действуют как импринтированные промоторы или как энхансеры и обогащены мотивами факторов транскрипции ELF5, EOMES и CDX2. Это в основном единичные элементы LTR, которые потеряли связанные с ними ретровирусные

гены. Показано, что неканонически импринтированные промоторы ERVK LTR взаимодействуют с H3K27me3 во внезародышевых тканях [31]. Также обнаружены примеры неканонически импринтированных промоторов ERVK LTR, управляющих во внезародышевых тканях транскрипцией не только некодирующих РНК, но также опосредующих импринтинг белок-кодирующих генов. Одним из таких примеров является неканонически импринтированный ERVK LTR (RLTR15), расположенный в интроне 1 гена *Gab1* с импринтированной отцовской экспрессией на эмбриональной стадии E7.5 мыши. RLTR15 действует как альтернативный промотор для гена *Gab1* на отцовском аллеле в плаценте [46]. В плацентарных тканях постимплантационного эмбриона неканонически импринтированные промоторы ERVK LTR становятся ДМР с метилированием материнского аллеля, тогда как в эмбриональных тканях метилируются оба аллеля, что приводит к подавлению экспрессии с этих промоторов. Таким образом, в дополнение к их роли в стимулировании неканонической экспрессии импринтированных генов вставки ретровирусов могут выступать в качестве альтернативных промоторов для неимпринтированных генов в трофобласте плаценты [5].

Одна из гипотез предполагает возникновение импринтинга в результате защитного механизма против экзогенной ДНК, основанного на метилировании ДНК [59, 60]. Гипотеза была сформулирована на результатах работ, в которых было показано, что трансген TGA, содержащий ретровирусные последовательности, при вставке в геном мыши перед имплантацией становился сильно метилированным к середине беременности, проявляя при этом признаки импринтинга [61, 62]. Высказанная гипотеза предполагала некоторые сходства в последовательности ДНК между импринтированными областями и ретротранспозонами. В частности, в некоторых исследованиях предполагалось, что импринтированные области обогащены ретротранспозонами LINE-1 [63], однако дальнейшая проверка показала, что это не так [64]. Только некоторые импринтированные гены имели явные признаки сходства с ретротранспозонами или того, что они сами были ретротранспозированы ([65–67], обзор в [68]).

С другой стороны, оказалось, что импринтированные гены и мобильные генетические элементы имеют общие механизмы регуляции с участием белков KRAB-ZFP. Белки KRAB-ZFP являются частью защитной системы, основной ролью которой, по-видимому, являются распознавание и инактивация ретротранспозированных элементов [69–72]. Белки KRAB-ZFP, в частности белок ZFP57, отвечают за нацеливание на последовательности, подлежащие репрессии. Затем с KRAB-доменом этих белков связывается транскрипционный корепрессор KAP1, инициирующий подавление

ние транскрипции соседних последовательностей путем привлечения гистоновой метилтрансферазы SETDB1, которая добавляет репрессивную метку H3K9me3, а также ДНК-метилтрансферазы и белка HP1. Белки KRAB-ZFP кодируются быстро эволюционирующим семейством генов [69], что, вероятно, отражает необходимость адаптации к появлению новых эндогенных ретровирусов (ERV) и ретротранспозонов. Таким образом, по мере появления новых мобильных генетических элементов происходит отбор генов новых белков KRAB-ZFP со связывающим доменом, который может распознавать таргетную последовательность в новом элементе [72, 73].

К семейству KRAB-ZFP принадлежат белок ZFP57 и недавно идентифицированный ZFP445 [35], играющие ключевую роль в установлении импринтинга. Как и другие члены семейства KRAB-ZFP, белки ZFP57 и ZFP445 также связываются и с мобильными генетическими элементами [74, 75]. Возможно, что при возникновении нового белка KRAB-ZFP для борьбы с новым мобильным генетическим элементом гены хозяина, имеющие аналогичную таргетную последовательность, попали под контроль системы KRAB-ZF/KAP/DNMT и стали импринтированными в тех случаях, когда это поддерживалось отбором в рамках классического конфликта полов [76].

Таким образом, импринтированная экспрессия генов использует те же механизмы, что и защита генома от ретровирусов и ретротранспозонов. Мотив распознавания белка ZFP57 (TGCCGC) присутствует практически во всех известных импринтированных генах [77]. Вместе белки ZFP57 и ZFP445 связываются со всеми известными импринтированными генами мыши и человека, за исключением *Peg10*, который сам имеет ретровирусное происхождение и, видимо, регулируется еще одним белком из семейства KRAB-ZFP [60]. Скорее всего существуют и другие представители этого семейства, играющие роль в геномном импринтинге, так как гомозиготные мутации в ZFP57 приводят к потере импринтинга только у некоторых генов [78]. В частности, недавно была выявлена роль белка ZFP568 в регуляции специфичного для плаценты промотора гена *Igf2* у мышей [70]. Кроме того, множество генов с высокой экспрессией в плаценте и мозге потенциально экспрессируются со специфичных для плаценты антисмысловых промоторов LINE-1 [79]. Учитывая, что подавление активности LINE-1 происходит также при участии различных представителей семейства белков KRAB-ZFP [80], возможно, что экспрессия генов с части таких промоторов будет иметь импринтированные черты. Это открывает возможности для дальнейшего поиска новых импринтированных регуляторных областей в геноме плаценты и участников эпигенетической регуляции неравной экспрессии генов с родительских аллелей.

СМЕЩЕННАЯ ЭКСПРЕССИЯ РОДИТЕЛЬСКИХ АЛЛЕЛЕЙ В ПЛАЦЕНТЕ ЧЕЛОВЕКА

Отличительной чертой импринтированных генов является экспрессия только с отцовского или материнского гомолога, обеспечивающая функциональную гаплоидизацию локусов. И действительно, в плаценте на всем протяжении беременности импринтированные гены *MEG3*, *PHLDA2*, *IGF2*, *H19PEG10*, *DLK*, *KCNQ1OT1* и *MEST* имеют 100%-ную моноаллельную экспрессию только с одного родительского гомолога, при этом второй аллель полностью выключен. Такой характер экспрессии характерен не только для импринтированных генов, кодирующих белки, но и для генов lncRNA, которые функционируют в основном как эпигенетические регуляторы поддержания точной моноаллельной экспрессии, согласно родительскому происхождению. Подобная моноаллельная экспрессия жестко контролируется, а генетические нарушения несовместимы с нормальным развитием эмбриона [81]. По-видимому, это наиболее важные в эволюции импринтированные гены, поскольку такой характер импринтированной экспрессии сохраняется в плаценте не только у человека, но и у других млекопитающих [2, 81, 82].

Изменение экспрессии таких импринтированных генов приводит к нарушению эмбрионального развития. Так, в плацентах доношенных детей с задержкой внутриутробного роста и развития плода было показано смещение экспрессии (<90%) двух импринтированных генов с отцовской экспрессией *GPR1-AS1* и *ZDBF2*, расположенных в локусе 2q33, а также *IGF2* (11p15.5) [83, 84].

Некоторые импринтированные гены демонстрируют смещенную экспрессию родительских гомологов, когда родительский аллель, который должен быть полностью подавлен в результате импринтинга, все же экспрессируется, хотя и в меньшей степени, чем второй активный аллель. Показано, что в плаценте здоровых доношенных детей до 39% импринтированных генов имеют смещенную экспрессию (<90% от всех молекул РНК транскриптов приходится на активный аллель) [81]. Так, Пилвар с коллегами [2] обнаружили в плаценте человека неравную импринтированную экспрессию родительских аллелей у 14 из 91 (15.4%) проанализированных импринтированных генов. Смещение экспрессии определяли на основании секвенирования РНК, когда только 65–90% всех транскриптов приходилось на активный неметилированный аллель. Из них 10 генов имели отцовскую экспрессию: *MKRN3*, *CPXM2*, *DNMT1*, *DCAF10*, *GRHL1*, *MCCC1*, *NUDT12*, *ZDBF2*, *PLEKHG4B*, *RHOBTB3*, и только 4 гена — материнскую экспрессию: *GRB10*, *NLRP2*, *NAA60* и *KLHDC10*. Примечательно, что ни один из этих генов не был специфичным для плаценты. Эти гены (за исключе-

нием *MKRN3*) транскрибируются либо в широком диапазоне тканей, либо предпочтительно в каком-либо другом органе. Смещение экспрессии (<90%) было продемонстрировано и в другом исследовании для гена *RHOBTB3* с отцовской и гена *TFPI2* с материнской экспрессией [81]. Также показано, что гены *N4BP2L1*, *DCAF10*, *PDE4D*, *FAM196A*, *RGMA*, *AGBL3*, *MCCC1*, *ZC3H12C*, *DNMT1*, *AIM1*, *ZNF396*, *FAM20A*, *GLIS3* и *LIN28B* импринтированы и экспрессируются с отцовского аллеля только в плаценте [85]. Тем не менее эти гены имели смещенный уровень метилирования в трофобластической оболочке (34.1% против 50% в норме для импринтированных генов) [86].

Также известно, что некоторые гены в плаценте характеризуются значительной вариацией уровня экспрессии, приводящей к так называемому полиморфному импринтингу [85, 87]. В результате в одних образцах плаценты эти гены имеют импринтированную, а в других — неимпринтированную экспрессию [87]. Так, полиморфная импринтированная экспрессия была описана в плаценте для генов *IGF2R* и *SLC22A2* [86]. Ген *SLC38A4* показал полиморфный статус в пяти плацентах крупного рогатого скота, причем три демонстрировали отцовскую моноаллельную экспрессию и две — биаллельную экспрессию [88].

Причинами смещенной экспрессии импринтированных генов могут быть: мозаицизм по метилированию, когда часть клеток имеет другой характер метилирования, отличный от импринтированного, что свойственно, например, для тканеспецифичного импринтинга; случайный отбор и размножение клеток, имеющих ошибки установления импринтинга в зародышевой линии или поддержания метилирования после репрограммирования.

Наличие мозаицизма по характеру метилирования в импринтированных генах может свидетельствовать о присутствии в клетках соматических эпимутаций. Такие эпимутации могли возникнуть в онтогенезе во время второй волны репрограммирования, которая происходит сразу после оплодотворения. В это время материнский и отцовский геномы подвергаются деметилированию, за исключением импринтированных генов, которые имеют герминативные ДМР и защищены от такого стирания путем формирования комплекса *ZFP57/TRIM28*, с помощью которого обеспечивается доставка ядерного белка *DNMT1* в регионы импринтируемых генов, что гарантирует устойчивость метилирования при репрограммировании, метилтрансфераза *SETDB1* также обеспечивает дополнительный контроль метилирования. Кроме того, *ZFP57* и *ZFP445* играют ключевую роль в установлении импринтинга [35]. Следовательно, мутации в этих генах могут ослабить контроль установления и поддержания импринтинга. И действительно, мутации в гене *ZFP57* приводят к сниже-

нию уровня метилирования ДМР импринтированных локусов *PLAGL1*, *GRB10* и *PEG3* человека [89]. Мутации в гене субкортикального материнского комплекса *NLRP7*, необходимого для запуска эмбрионального генома, также приводят к зародышевым и постзиготическим мультилокусным нарушениям импринтинга, несовместимым с нормальным развитием эмбриона [90, 91]. Нокаут *DNMT1* мыши обеспечивает деметилирование всех импринтированных локусов [92]. Потеря экспрессии *Trim28* приводит к снижению уровня метилирования генов *Igf2/H19* и *Snrpn* [32]. По-видимому, соматическое гипометилирование импринтированных генов формируется на преимплантационном этапе развития и обусловлено нарушением механизмов поддержания импринтинга в соматических клетках зародыша. Мозаицизм по гипометилированию может возникнуть и после имплантации в результате неспособности точно воспроизводить импринтированный статус генов при клеточных делениях.

Таким образом, для импринтированных генов не всегда характерна моноаллельная экспрессия только с одного родительского гомолога, когда второй аллель полностью выключен, а иногда наблюдается смещенная экспрессия родительских гомологов, а также полиморфный импринтинг.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Геномный импринтинг — важный феномен, позволяющий геномам родителей управлять развитием эмбриона и конкурировать за материнские ресурсы. Такой контроль возможен благодаря влиянию импринтированных генов на работу генных сетей и высокоуровневых регуляторов, обеспечивающих эпигенетический и ресурсный ландшафт для разворачивания программы индивидуального развития эмбриона. Обнаружение кластеров импринтированных регуляторных РНК еще больше указывает на роль импринтинга как регуляторного механизма. Геномный импринтинг поднимает вопрос о возможном влиянии отцовских генов на этот процесс с целью организации преимущественной экспрессии отцовских аллелей. Роль ретровирусов и ретротранспозонов в геномном импринтинге, предсказанная еще 30 лет назад, находит все больше подтверждений. Одним из таких подтверждений является выявленная роль эндогенных ретровирусов в установлении неканонического импринтинга с преимущественной экспрессией отцовских аллелей.

Следует отметить, что нарушения неканонического импринтинга обнаруживаются при различных осложнениях беременности, включая преэклампсию, ограничение внутриутробного роста или преждевременные роды [28]. Для человека разработаны и успешно применяются вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ), в то же

время эффективность ВРТ сегодня составляет всего 32.6% [93]. Контролируемая стимуляция и супер-овуляция, которые являются стандартными для протокола экстракорпорального оплодотворения, изменяют микросреду в фолликуле и, возможно, могут привести к образованию ооцитов с измененным статусом метилирования как канонически, так и неканонически импринтированных генов. ИК-СИ, применяемая для преодоления мужского фактора бесплодия, также может оказывать влияние на эпигенетическую регуляцию.

Еще один аспект важности изучения этого механизма заключается в низкой эффективности соматического клонирования высокопородных животных, которое составляет всего 3–5% [94]. Возможно, что это связано с неспособностью обеспечить эпигенетический рисунок неканонического импринтинга. Так, мыши, лишенные H3K27me3, демонстрируют чрезмерный рост плаценты [5].

Открытые новые базовые механизмы импринтинга несомненно в ближайшей перспективе позволят расширить список участников этого процесса и помогут лучше понять роль импринтинга в эмбриональном развитии млекопитающих и их эволюции.

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. *Gui B., Slone J., Huang T.* Perspective: Is random monoallelic expression a contributor to phenotypic variability of autosomal dominant disorders? // *Front. Genet.* 2017. V. 29(8). P. e191. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00191>
2. *Pilvar D., Reiman M., Pilvar A., Laan M.* Parent-of-origin-specific allelic expression in the human placenta is limited to established imprinted loci and it is stably maintained across pregnancy // *Clin. Epigenet.* 2019. V. 11. P. e94. <https://doi.org/10.1186/s13148-019-0692-3>
3. *Tucci V., Isles A.R., Kelsey G. et al.* Genomic imprinting and physiological processes in mammals // *Cell.* 2019. V. 176. P. 952–965. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.043>
4. *Bogutz A.B., Brind A.J., Kobayashi H. et al.* Evolution of imprinting via lineage-specific insertion of retroviral promoters // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. P. e5674. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13662-9>
5. *Raas M.W., Zijlmans D.W., Vermeulen M. et al.* There is another: H3K27me3-mediated genomic imprinting // *Trends Genet.* 2022. V. 38(1). P. 82–96. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.06.017>
6. *Cierna Z., Varga I., Danihel L.J. et al.* Intermediate trophoblast-A distinctive, unique and often unrecognized population of trophoblastic cells // *Ann. Anat.* 2016. V. 204. P. 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2015.10.003>
7. *Norwitz E.R.* Defective implantation and placentation: Laying the blueprint for pregnancy complications // *Reprod. Biomed. Online.* 2006. V. 13(4). P. 591–599. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)60649-9](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60649-9)
8. *Thamban T., Agarwaal V., Khosla S.* Role of genomic imprinting in mammalian development // *J. Biosci.* 2020. V. 45. P. e20.
9. *Varrault A., Dantec C., Le Digarcher A. et al.* Identification of *Plagl1/Zac1* binding sites and target genes establishes its role in the regulation of extracellular matrix genes and the imprinted gene network // *Nucl. Acids Res.* 2017. V. 45(18). P. 10466–10480. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx672>
10. *Hanna C.W.* Placental imprinting: Emerging mechanisms and functions // *PLoS Genet.* 2020. V. 16(4). P. e1008709. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008709>
11. *Starks R.R., Kaur H., Tuteja G.* Mapping cis-regulatory elements in the midgestation mouse placenta // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. P. e22331. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01664-x>
12. *Woods L., Perez-Garcia V., Hemberger M.* Regulation of placental development and its impact on fetal growth-new insights from mouse models // *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 2018. V. 9. P. e570. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00570>
13. *Miri K., Latham K., Panning B. et al.* The imprinted polycomb group gene *Sfmbt2* is required for trophoblast maintenance and placenta development // *Development.* 2013. V. 140. P. 4480–4489. <https://doi.org/10.1242/dev.096511>
14. *Tang P., Miri K., Varmuza S.* Unique trophoblast chromatin environment mediated by the PcG protein *SFMBT2* // *Biol. Open.* 2019. V. 8(8). P. e043638. <https://doi.org/10.1242/bio.043638>
15. *Andergassen D., Dotter C.P., Wenzel D. et al.* Mapping the mouse Allelome reveals tissue-specific regulation of allelic expression // *Elife.* 2017. V. 6. P. e25125. <https://doi.org/10.7554/eLife.25125>
16. *Schertzer M.D., Bracer K.C., Starmer J. et al.* lncRNA-induced spread of Polycomb controlled by genome architecture, RNA abundance, and CpG island DNA // *Mol. Cell.* 2019. V. 75(3). P. 523–537. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.05.028>
17. *Bartel D.P.* Metazoan MicroRNAs // *Cell.* 2018. V. 173. P. 20–51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>
18. *Hayder H., O'Brien J., Nadeem U., Peng C.* MicroRNAs: Crucial regulators of placental development // *Reproduction.* 2018. V. 155(6). P. R259–R271. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0603>
19. *Malnou E.C., Umlauf D., Mouysset M., Cavaille J.* Imprinted microRNA gene clusters in the evolution, de-

- velopment, and functions of mammalian placenta // *Front. Genet.* 2019. V. 9. P. e706.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00706>
20. Inno R., Kikas T., Lillepea K., Laan M. Coordinated expressional landscape of the human placental miRNome and transcriptome // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. V. 9. P. e697947.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.697947>
 21. Kaneko-Ishino T., Ishino F. Retrotransposon silencing by DNA methylation contributed to the evolution of placental and genomic imprinting in mammals // *Dev. Growth Differ.* 2010. V. 52(6). P. 533–543.
<https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2010.01194.x>
 22. Ito M., Sferruzzi-Perri A.N., Edwards C.A. et al. A trans-homologue interaction between reciprocally imprinted miR-127 and Rtl1 regulates placenta development // *Development.* 2015. V. 142(14). P. 2425–2430.
<https://doi.org/10.1242/dev.121996>
 23. Bentwich I. Prediction and validation of microRNAs and their targets // *FEBS Lett.* 2005. V. 579(26). P. 5904–5910.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.09.040>
 24. Haig D., Mainieri A. The evolution of imprinted microRNAs and their RNA targets // *Genes (Basel).* 2020. V. 11(9). P. e1038.
<https://doi.org/10.3390/genes11091038>
 25. Noguer-Dance M., Abu-Amero S., Al-Khtib M. et al. The primate-specific microRNA gene cluster (*C19MC*) is imprinted in the placenta // *Hum. Mol. Genet.* 2010. V. 19(18). P. 3566–3582.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddq272>
 26. Gottlieb A., Flor I., Nimzyk R. et al. The expression of miRNA encoded by *C19MC* and miR-371-3 strongly varies among individual placentas but does not differ between spontaneous and induced abortions // *Protoplasma.* 2021. V. 258(1). P. 209–218.
<https://doi.org/10.1007/s00709-020-01548>
 27. Gu Y., Sun J., Groome L.J., Wang Y. Differential miRNA expression profiles between the first and third trimester human placentas // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2013. V. 304(8). P. 836–843.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00660.2012>
 28. Munjas J., Sopic M., Stefanovic A. et al. Non-coding RNAs in preeclampsia-molecular mechanisms and diagnostic potential // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22(19). P. e10652.
<https://doi.org/10.3390/ijms221910652>
 29. Delorme-Axford E., Donker R.B., Mouillet J.F. et al. Human placental trophoblasts confer viral resistance to recipient cells // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. P. 12048–12053.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1304718110>
 30. Ishida Y., Zhao D., Ohkuchi A. et al. Maternal peripheral blood natural killer cells incorporate placenta-associated microRNAs during pregnancy // *Int. J. Mol. Med.* 2015. V. 35. P. 1511–1524.
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2157>
 31. Inoue K., Hirose M., Inoue H. et al. The rodent-specific microRNA cluster within the *Sfmbt2* gene is imprinted and essential for placental development // *Cell Rep.* 2017. V. 19. P. 949–956.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.018>
 32. Farhadova S., Gomez-Velazquez M., Feil R. Stability and lability of parental methylation imprints in development and disease // *Genes (Basel).* 2019. V. 10(12). P. e999.
<https://doi.org/10.3390/genes10120999>
 33. Zeng Y., Chen T. DNA methylation reprogramming during mammalian development // *Genes (Basel).* 2019. V. 10(4). P. e257.
<https://doi.org/10.3390/genes10040257>
 34. Huang Y., Liu H., Du H. et al. Developmental features of DNA methylation in CpG islands of human gametes and preimplantation embryos // *Exp. Ther. Med.* 2019. V. 17(6). P. 4447–4456.
<https://doi.org/10.3892/etm.2019.7523>
 35. Takahashi N., Coluccio A., Thorball C.W. et al. *ZNF445* is a primary regulator of genomic imprinting // *Genes Dev.* 2019. V. 33. P. 49–54.
<https://doi.org/10.1101/gad.320069.118>
 36. Decato B.E., Lopez-Tello J., Sferruzzi-Perri A.N. et al. DNA methylation divergence and tissue specialization in the developing mouse placenta // *Mol. Biol. Evol.* 2017. V. 34. P. 1702–1712.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msx112>
 37. Duffie R., Aijan S., Greenberg M.V. et al. The *Gpr1/Zdbf2* locus provides new paradigms for transient and dynamic genomic imprinting in mammals // *Genes Dev.* 2014. V. 28. P. 463–478.
<https://doi.org/10.1101/gad.232058.113>
 38. Chen Z., Djekidel M.N., Zhang Y. Distinct dynamics and functions of H2AK119ub1 and H3K27me3 in mouse preimplantation embryos // *Nat. Genet.* 2021. V. 53(4). P. 551–563.
<https://doi.org/10.1038/s41588-021-00821-2>
 39. Jambhekar A., Dhall A., Shi Y. Roles and regulation of histone methylation in animal development // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2019. V. 20(10). P. 625–641.
<https://doi.org/10.1038/s41580-019-0151-1>
 40. Healy E., Mucha M., Glancy E. et al. PRC2.1 and PRC2.2 synergize to coordinate H3K27 trimethylation // *Mol. Cell.* 2019. V. 76(3). P. 437–452.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.08.012>
 41. Cheutin T., Cavalli G. The multiscale effects of polycomb mechanisms on 3D chromatin folding // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2019. V. 54(5). P. 399–417.
<https://doi.org/10.1080/10409238.2019.1679082>
 42. Yang P., Wang Y., Macfarlan T.S. The role of KRAB-ZFPs in transposable element repression and mammalian evolution // *Trends Genet.* 2017. V. 33(11). P. 871–881.
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.08.006>
 43. Xu Q., Xie W. Epigenome in early mammalian development: inheritance, reprogramming and establishment // *Trends Cell Biol.* 2018. V. 28. P. 237–253.
 44. Prokopuk L., Stringer J.M., White C.R. et al. Loss of maternal EED results in postnatal overgrowth // *Clin.*

- Epigenetics. 2018. V. 10(1) P. e95.
<https://doi.org/10.1186/s13148-018-0526-8>
45. *Hanna C.W., Gavin K.* Features and mechanisms of canonical and noncanonical genomic imprinting // *Genes Dev.* 2021. V. 35(11–12). P. 821–834.
<https://doi.org/10.1101/gad.348422.121>
46. *Hanna C.W.* Endogenous retroviral insertions drive non-canonical imprinting in extra-embryonic tissues // *Genome Biol.* 2019. V. 20. P. e225.
<https://doi.org/10.1186/s13059-019-1833-x>
47. *Chen Z., Yin Q., Inoue A. et al.* Allelic H3K27me3 to allelic DNA methylation switch maintains noncanonical imprinting in extraembryonic cells // *Sci. Adv.* 2019. V. 5(12). P. e7246.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.aay7246>
48. *Zhang W., Chen Z., Yin Q. et al.* Maternal-biased H3K27me3 correlates with paternal-specific gene expression in the human morula // *Genes Dev.* 2019. V. 33(7–8). P. 382–387.
<https://doi.org/10.1101/gad.323105.118>
49. *Enriquez-Gasca R., Gould P.A., Rowe H.M.* Host gene regulation by transposable elements: the new, the old and the ugly // *Viruses.* 2020. V. 12(10). P. e1089.
<https://doi.org/10.3390/v12101089>
50. *Senft A.D., Macfarlan T.S.* Transposable elements shape the evolution of mammalian development // *Nat. Rev. Genet.* 2021. V. 22(11). P. 691–711.
<https://doi.org/10.1038/s41576-021-00385-1>
51. *Zhang X., Muglia L.J.* Baby's best Friend: Endogenous retroviruses and the evolution of eutherian reproduction // *Placenta.* 2021. V. 15(113). P. 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2021.02.011>
52. *Schust D.J., Bonney E.A., Sugimoto J. et al.* The immunology of syncytialized trophoblast // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 2(4). P. e1767.
<https://doi.org/10.3390/ijms22041767>
53. *Sugimoto J., Sugimoto M., Bernstein H. et al.* A novel human endogenous retroviral protein inhibits cell-cell fusion // *Sci. Rep.* 2013. V. 3. P. e1462.
<https://doi.org/10.1038/srep01462>
54. *Roberts R.M., Ezashi T., Schulz L.C. et al.* Syncytins expressed in human placental trophoblast // *Placenta.* 2021. V. 113. P. 8–14.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2021.01.006>
55. Каталог импринтированных генов. <http://igc.otago.ac.nz>.
56. *Roberts R.M., Green J.A., Schulz L.C.* The evolution of the placenta // *Reproduction.* 2016. V. 152. P. 179–189.
<https://doi.org/10.1530/REP-16-0325>
57. *Henke C., Strissel P.L., Schubert M.T.* Selective expression of sense and antisense transcripts of the sushi-ichi-related retrotransposon-derived family during mouse placentogenesis // *Retrovirology.* 2015. V. 12. P. e9.
<https://doi.org/10.1186/s12977-015-0138-8>
58. *Miao J., Zhu Y., Xu L. et al.* MiR-181b-5P inhibits trophoblast cell migration and invasion through targeting S1PR1 in multiple abnormal trophoblast invasion-related events // *Mol. Med. Rep.* 2020. V. 22(5). P. 4442–4451.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11515>
59. *Barlow D.P.* Methylation and imprinting: From host defense to gene regulation? // *Science.* 1993. V. 260. P. 309–310.
<https://doi.org/10.1126/science.8469984>
60. *Ondicova M., Oakey R.J., Walsh C.P.* Is imprinting the result of “friendly fire” by the host defense system? // *PLoS Genet.* 2020. V. 16. P. e1008599.
<https://doi.org/10.1126/science.8469984>
61. *Jahner D., Stuhlmann H., Stewart C.L. et al.* De novo methylation and expression of retroviral genomes during mouse embryogenesis // *Nature.* 1982. V. 298. P. 623–628.
<https://doi.org/10.1038/298623a0>
62. *Chaillet J., Vogt T., Beier D., Leder P.* Parental-specific methylation of an imprinted transgene is established during gametogenesis and progressively changes during embryogenesis // *Cell.* 1991. V. 66. P. 77–83.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90140-t](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90140-t)
63. *Walter J., Hutter B., Khare T., Paulsen M.* Repetitive elements in imprinted genes // *Cytogenet. Genome Res.* 2006. V. 113. P. 109–115.
<https://doi.org/10.1159/000090821>
64. *Cowley M., de Burca A., McCole R.B. et al.* Short Interspersed Element (SINE) depletion and Long Interspersed Element (LINE) abundance are not features universally required for imprinting // *PLoS One.* 2011. V. 6. P. e18953.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018953>
65. *Wood A.J., Bourc'his D., Bestor T.H., Oakey R.J.* Allele-specific demethylation at an imprinted mammalian promoter // *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. P. 7031–7039.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkm742>
66. *Wood A.J., Roberts R.G., Monk D. et al.* A screen for retrotransposed imprinted genes reveals an association between X chromosome homology and maternal germline methylation // *PLoS Genet.* 2007. V. 3. P. e20.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030020>
67. *Youngson N.A., Kocalkowski S., Peel N., Ferguson-Smith A.C.* A small family of sushi-class retrotransposon-derived genes in mammals and their relation to genomic imprinting // *J. Mol. Evol.* 2005. V. 61. P. 481–490.
<https://doi.org/10.1007/s00239-004-0332-0>
68. *Cowley M., Oakey R.J.* Retrotransposition and genomic imprinting // *Brief. Funct. Genomics.* 2010. V. 9. P. 340–346.
<https://doi.org/10.1093/bfpg/elq015>
69. *Thomas J.H., Schneider S.* Coevolution of retroelements and tandem zinc finger genes // *Genome Res.* 2011. V. 21. P. 1800–1812.
<https://doi.org/10.1101/gr.121749.111>
70. *Yang P., Wang Y., Hoang D. et al.* A placental growth factor is silenced in mouse embryos by the zinc finger protein ZFP568 // *Science.* 2017. V. 356. P. 757–759.
<https://doi.org/10.1126/science.aah6895>
71. *Helleboid P., Heusel M., Duc J. et al.* The interactome of KRAB zinc finger proteins reveals the evolutionary his-

- tory of their functional diversification // *EMBO J.* 2019. V. 38. P. e101220.
<https://doi.org/10.15252/embj.2018101220>
72. *Jacobs F.M., Greenberg D., Nguyen N. et al.* An evolutionary arms race between KRAB zinc-finger genes *ZNF91/93* and *SVA/L1* retrotransposons // *Nature*. 2014. V. 516. P. 242–245.
 73. *Rowe H.M., Friedli M., Offner S. et al.* De novo DNA methylation of endogenous retroviruses is shaped by KRAB-ZFPs/KAP1 and ESET // *Development*. 2013. V. 140. P. 519–529.
<https://doi.org/10.1242/dev.087585>
 74. *Imbeault M., Helleboid P.Y., Trono D.* KRAB zinc-finger proteins contribute to the evolution of gene regulatory networks // *Nature*. 2017. V. 543. P. 550–554.
<https://doi.org/10.1038/nature21683>
 75. *Strogantsev R., Krueger F., Yamazawa K. et al.* Allele-specific binding of *ZFP57* in the epigenetic regulation of imprinted and non-imprinted monoallelic expression // *Genome Biol.* 2015. V. 16. P. e112.
<https://doi.org/10.1186/s13059-015-0672-7>
 76. *Moore T., Haig D.* Genomic imprinting in mammalian development: A parental tug-of-war // *TIG*. 1991. V. 7. P. 45–49.
[https://doi.org/10.1016/0168-9525\(91\)90230-N](https://doi.org/10.1016/0168-9525(91)90230-N)
 77. *Quenneville S., Verde G., Corsinotti A. et al.* In embryonic stem cells, *ZFP57/KAP1* recognize a methylated hexanucleotide to affect chromatin and DNA methylation of imprinting control regions // *Mol. Cell*. 2011. V. 44. P. 361–372.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.032>
 78. *Li X., Ito M., Zhou F. et al.* A maternal-zygotic effect gene, *Zfp57*, maintains both maternal and paternal imprints // *Dev. Cell*. 2008. V. 15. P. 547–557.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.08.014>
 79. *Criscione S.W., Theodosakis N., Micevic G. et al.* Genome-wide characterization of human L1 antisense promoter-driven transcripts // *BMC Genomics*. 2016. V. 17. P. e463.
<https://doi.org/10.1186/s12864-016-2800-5>
 80. *Castro-Diaz N., Ecco G., Coluccio A. et al.* Evolutionally dynamic L1 regulation in embryonic stem cells // *Genes Dev.* 2014. V. 28(13). P. 397–409.
<https://doi.org/10.1101/gad.241661.114>
 81. *Vincenz C., Lovett J.L., Wu W. et al.* Loss of imprinting in human placentas is widespread, coordinated, and predicts birth phenotypes // *Mol. Biol. Evol.* 2020. V. 37(2). P. 429–441.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msz226>
 82. *Wang X.X., Miller D.C., Harman R. et al.* Paternal expressed genes predominate in the placenta // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. P. 10705–10710.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1308998110>
 83. *Monteagudo-Sánchez A., Sánchez-Delgado M., Hernández J.R. et al.* Differences in expression rather than methylation at placenta-specific imprinted loci is associated with intrauterine growth restriction // *Clin. Epigenetics*. 2019. V. 11(1). P. e35.
<https://doi.org/10.1186/s13148-019-0630-4>
 84. *Kappil M.A., Green B.B., Armstrong D.A. et al.* Placental expression profile of imprinted genes impacts birth weight // *Epigenetics*. 2015. V. 10(9). P. 842–849.
<https://doi.org/10.1080/15592294.2015.1073881>
 85. *Court F., Tayama C., Romanelli V. et al.* Genome-wide parent-of-origin DNA methylation analysis reveals the intricacies of human imprinting and suggests a germline methylation-independent mechanism of establishment // *Genome Res.* 2014. V. 24(4). P. 554–569.
<https://doi.org/10.1101/gr.164913.113>
 86. *Hanna C.W., Penaherrera M.S., Saadeh H. et al.* Pervasive polymorphic imprinted methylation in the human // *Genome Res.* 2016. V. 26(6). P. 756–767.
<https://doi.org/10.1101/gr.196139.115>
 87. *Sanchez-Delgado M., Riccio A., Eggermann T. et al.* Causes and consequences of multi-locus imprinting disturbances in humans // *Trends Genet.* 2016. V. 32(7). P. 444–455.
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.05.001>
 88. *Xu D., Zhang C., Li J. et al.* Polymorphic imprinting of *SLC38A4* gene in bovine placenta // *Biochem. Genet.* 2018. V. 56(6). P. 639–649.
<https://doi.org/10.1007/s10528-018-9866-5>
 89. *Sanli I., Feil R.* Chromatin mechanisms in the developmental control of imprinted gene expression // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2015. V. 67. P. 139–147.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.04.004>
 90. *Саженова Е.А., Никитина Т.В., Скрябин Н.А. и др.* Эпигенетический статус импринтированных генов в плаценте при привычном невынашивании беременности // *Генетика*. 2017. Т. 53. № 3. С. 364–377.
<https://doi.org/10.7868/s0016675817020096>
 91. *Sazhenova E.A., Nikitina T.V., Vasilyev S.A. et al.* *NLRP7* variants in spontaneous abortions with multilocus imprinting disturbances from women with recurrent pregnancy loss // *J. Assisted Reprod. Genet.* 2021. V. 38(11). P. 2893–2908.
<https://doi.org/10.1007/s10815-021-02312-z>
 92. *Hirasawa R., Chiba H., Kaneda M. et al.* Maternal and zygotic *dnmt1* are necessary and sufficient for the maintenance of DNA methylation imprints during preimplantation development // *Genes Dev.* 2008. V. 22. P. 1607–1616.
<https://doi.org/10.1101/gad.1667008>
 93. *Wyns C., De Geyter C., Calhaz-Jorge C. et al.* ART in Europe, 2017: Results generated from European registries by ESHRE. European IVF-Monitoring Consortium (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) // *Hum. Reprod. Open*. 2021. V. 2021(3). P. e026.
<https://doi.org/10.1093/hropen/hoab026>
 94. *Kobayashi H.* Canonical and non-canonical genomic imprinting in rodents // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. V. 9. P. e713878.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.713878>

Biased Expression of Parental Alleles in the Human Placenta

E. A. Sazhenova^{a, *}, S. A. Vasilev^a, and I. N. Lebedev^a

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

**e-mail: elena.sazhenova@medgenetics.ru*

The biased expression of parental alleles plays a fundamental role in the formation of the placenta as a multifunctional organ necessary for the development and survival of the fetus. First of all, this is expressed in the phenomenon of imprinting, when only the maternal or paternal allele is expressed in placental cells. The placenta uses an extended range of imprinting mechanisms compared to the embryo — histone modifications that suppress or, conversely, activate the expression of nearby genes, regulatory sequences and genes derived from retroviruses or retrotransposons, microRNAs that function as antisense RNAs and participate in transcriptional and post-transcriptional regulation of gene expression. In addition, incomplete suppression of the activity of one of the parental alleles is detected in the placenta, leading to a biased imprinted expression of some genes. This review shows the role of biased expression of parental alleles in the development of placental structures of an embryo, discusses the mechanisms of epigenetic control of parental alleles, mainly expressed in the placenta.

Keywords: genomic imprinting, placenta, DNA methylation, histone modifications, imprinted microRNAs, retrotransposons, biased expression of imprinted genes.

ОБЗОРНЫЕ
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 577.21:616.127

ЭПИГЕНЕТИКА КАРДИОМИОПАТИЙ: МОДИФИКАЦИИ ГИСТОНОВ И МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК¹

© 2023 г. А. Н. Кучер¹, М. С. Назаренко¹, *

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

*e-mail: maria.nazarenko@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 14.04.2022 г.

После доработки 23.05.2022 г.

Принята к публикации 31.05.2022 г.

Кардиомиопатии — активно исследуемая клинически и генетически гетерогенная группа патологий миокарда. В настоящее время общепризнано, что наряду с генетическими факторами эпигенетические механизмы могут быть значимыми в определении как риска развития данной патологии, так и формирования клинических особенностей болезни. В статье приведен обзор научных публикаций, посвященных исследованию модификаций гистонов и ремоделирования хроматина, а также изменений метилирования ДНК при различных формах кардиомиопатий. Большинство работ в этой области сфокусировано на анализе эпигеномного профиля образцов миокарда у пациентов с дилатационной кардиомиопатией. При развитии кардиомиопатии (дилатационной, гипертрофической, ишемической, рестриктивной и аритмогенной) в миокарде происходят изменения на уровне эпигенетических процессов, что приводит к нарушению функциональной активности генов и дисбалансу метаболических путей, в том числе патогенетически значимых для развития заболеваний сердца. В эпигенетических изменениях, происходящих в миокарде, вовлечены также гены кардиомиопатий (*LMNA*, *TNNI3*, *ANKRD1*, *SLC25A4*, *EYA4*, *GATAD1*, *PRDM16* и *DMD*). Эпигенетические модификации, а также ферменты, регулирующие эпигенетические процессы, анализируются с точки зрения перспективности их использования для выявления новых значимых для кардиомиопатий молекулярных маркеров и метаболических путей, для разработки диагностических панелей и новых лекарственных препаратов. В то же время высокая клиническая и этиологическая гетерогенность кардиомиопатий, большое число разнообразных и взаимосвязанных эпигенетических процессов, которые происходят как в условиях физиологической нормы, так и в ходе патогенеза заболевания, указывают на необходимость расширения эпигенетических исследований при различных формах кардиомиопатий, в том числе на уровне эпигенома, транскриптома и эпитранскриптома с использованием омиксного анализа единичных клеток миокарда у человека и модельных животных, а также в клеточных линиях при моделировании заболевания.

Ключевые слова: кардиомиопатия, модификации гистонов, метилирование ДНК, ремоделирование хроматина.

DOI: 10.31857/S0016675823030086, **EDN:** IPXZDH

Эпигенетические процессы играют важную роль в реализации генетической программы, определяя особенности формирования разнообразных признаков (фенотипов) как в норме, так и при патологиях, в том числе и сердечно-сосудистой системы [1–4]. Основными эпигенетическими механизмами являются модификация гистонов (ацетилирование/деацетилирование, метилирование, убиквитинилирование, фосфорилирование, биотинилирование, сумоилирование и др.), метилирование ДНК и регуляция экспрессии генов с

помощью различных типов некодирующих РНК (нкРНК — miRNA, lncRNA, circRNA, piRNA и т.д.). Привлекательность эпигенетических исследований с медицинской точки зрения обусловлена возможностью с их помощью не только лучше понять патогенез, формирование клинической картины течения заболевания, но и на основании полученных данных разработать новые подходы к диагностике и лечению патологий. Такие ожидания в отношении эпигенетических маркеров связаны с различными типами кардиомиопатий [2, 5–10].

Кардиомиопатии (КМП) — клинически и этиологически гетерогенная группа патологий миокарда, которые вносят существенный вклад в развитие сердечной недостаточности и выступают в каче-

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0016675823030086 для авторизованных пользователей.

стве одной из основных причин внезапной сердечной смерти. В настоящее время существуют различные подходы к классификации КМП: выделяют семейные и спорадические формы; первичные (генетически обусловленные), вторичные (возникшие при воздействии широкого спектра эндогенных и экзогенных факторов) и смешанные (развиваются при комплексном воздействии генетических и средовых факторов); генетически детерминированные КМП подразделяют на унаследованные и возникшие вследствие мутаций *de novo*; с учетом морфофункциональных нарушений сердца КМП классифицируют на гипертрофическую (ГКМП), дилатационную (ДКМП), аритмогенную (АКМП; аритмогенная кардиомиопатия правого желудочка – АКМПЖ), рестриктивную (РКМП), некомпактный миокард (НКМ) левого желудочка (НКМЛЖ, иногда данное патологическое состояние относят к неклассифицированным КМП или рассматривают в качестве варианта фенотипа) и т.д. [11, 12]. Выделяют также другие формы КМП, такие как ишемическая (ИКМП, исключена из МКБ-11), диабетическая, алкогольная КМП, кардиомиопатии, обусловленные воздействием лекарственных средств и других внешних факторов (стресс-индуцированная, вызванные инфекционными агентами и др.) [13, 14].

Предложены более сложные и интегральные классификации КМП, учитывающие связь между генотипом и фенотипом, помогающие описать патологический фенотип у пациентов и членов их семей, которые имеют или, наоборот, не имеют симптомы заболевания, в контексте результатов их молекулярно-генетического обследования [15]. Примером такой классификации является MOGE(S), которая учитывает морфофункциональный фенотип КМП, вовлеченность в патологический процесс различных органов и систем, тип наследования, этиологию заболевания в случае выявления патогенных вариантов в генах КМП и функциональное состояние сердечно-сосудистой системы (стадию по American College of Cardiology/American Heart Association и функциональный класс по New York Heart Association). Не исключено, что эпигенетические маркеры могут дополнить существующие диагностические классификации КМП, особенно в том случае, когда не выявлены причинные для заболевания генетические варианты.

Регистрация изолированных и сочетанных форм КМП в одной и той же семье, случаи изменения патологического фенотипа со временем (переход от одной формы к другой), выявление смешанных типов КМП (НКМ/ГКМП, НКМ/ДКМП и другие), общность генетической компоненты для разных типов КМП, особенности пенетрантности и экспрессивности генов КМП с патогенными вариантами, разнообразный спектр клинических проявлений заболевания у носителей од-

ного и того же патогенного варианта, причем даже у монозиготных близнецов (что исключает возможность генетических модификаций) [16–26], указывают на то, что на патогенез КМП существенное влияние может оказывать эпигенетический компонент, который реализуется при воздействии средовых факторов с учетом индивидуальных генетических особенностей.

К настоящему времени выполнено большое число исследований, посвященных изучению эпигенетических маркеров (в том числе модификации гистонов, метилирование ДНК, регуляторные РНК – микроРНК, длинные некодирующие РНК и др.) при разных формах КМП, которые были обобщены в многочисленных публикациях (см., например, [1, 2, 27–36]). В то же время недостаточно работ, посвященных интеграции данных о специфичности модификаций гистонов, метилирования ДНК и моделирования хроматина при различных формах КМП, прежде всего в сравнительном аспекте.

Цель настоящего обзора заключается в обобщении информации о значимости эпигенетических факторов – модификаций гистонов и метилирования ДНК – в определении риска развития и характера течения различных форм КМП.

ГЕНЫ КАРДИОМИОПАТИЙ КАК УЧАСТНИКИ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ – МОДИФИКАЦИИ ГИСТОНОВ И МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК

Прежде всего следует отметить, что некоторые гены КМП и кодируемые ими белки вовлечены в эпигенетические процессы (табл. 1). В частности, четыре гена – *EYA4*, *GATAD1*, *PRDM16* и *DMD*, белковые продукты которых регулируют эпигенетические модификации, связаны с ДКМП, а ген *SLC25A4* – с ГКМП. В то же время патогенные варианты в эпигенетически значимом гене *ANKRD1* могут приводить к формированию одного из двух фенотипов – ДКМП или ГКМП, в гене *LMNA* – к ДКМП или АКМПЖ. Наибольшее количество клинических фенотипов КМП (ДКМП, ГКМП и РКМП) обусловлено мутациями в гене *TNNI3*. Следует отметить, что по данным других источников [21, 43] спектр КМП, которые могут быть связаны с генами, вовлеченными в эпигенетические процессы, существенно шире.

Среди эпигенетически значимых наибольшее число белковых продуктов генов КМП участвуют в модификациях гистоновых белков, контролируют конформацию хроматина (табл. 1): *PRDM16* обладает гистонметилтрансферазной активностью (специфичной для H3-K9), *EYA4* участвует в дефосфорилировании гистонов, *ANKRD1* – в связывании гистондеацетилазы, *GATAD1* вовлечен в организацию и ремоделирование хроматина. Бе-

Таблица 1. Примеры генов кардиомиопатий, вовлеченных в эпигенетические процессы

Ген	Связь с КМП по ClinGen	Участие белкового продукта гена в эпигенетических процессах
<i>EYA4</i>	Слабая с ДКМП	Дефосфорилирование гистонов
<i>GATAD1</i>	Слабая с ДКМП	Организация и ремоделирование хроматина
<i>PRDM16</i>	Слабая с ДКМП	Метилтрансферазная активность (специфичная для H3-K9)
<i>DMD</i>	X-сцепленная ДКМП	Содержит эпигенетические метки, управляющие архитектурой хроматина <i>DMD</i> , тем самым влияя на экспрессию гена
<i>SLC25A4</i>	Доказанная с ГКМП	Поддержание стабильности митохондриального генома
<i>ANKRD1</i>	Слабая с ДКМП; слабая с ГКМП	Связывание гистондеацетилазы
<i>LMNA</i>	Доказанная с ДКМП; слабая с АПЖКМП	Триметилирование гистона H3-K9; регуляция экспрессии посредством взаимодействия с эухроматином и с гетерохроматином через взаимодействие с LAD
<i>TNNI3</i>	Умеренная с ДКМП; доказанная с ГКМП; мало доказательств с РКМП	Взаимодействует с HDAC1 и регулирует экспрессию генов

Примечание. Составлено по [37–42]. LAD – ламин-ассоциированные домены.

лок *LMNA* задействован в регуляции триметилирования гистона H3-K9, а также реализует свой регуляторный потенциал на уровне экспрессии генов через взаимодействие с гетерохроматиновыми (посредством ламин-ассоциированных доменов – LAD) и эухроматиновыми регионами [40, 41].

Наличие патогенных вариантов в эпигенетически значимых генах КМП может обуславливать нарушение реализации эпигенетической программы и соответственно способствовать развитию патологических состояний. С этой точки зрения наиболее изучен эффект гена *LMNA*. Показано, что кардиомиоциты, полученные из плюрипотентных стволовых клеток с мутациями в гене *LMNA*, приводящими к развитию ДКМП, демонстрируют aberrantную морфологию ядра и специфические нарушения в периферическом хроматине, что сопровождается усилением экспрессии генов немиоцитарных путей, обычно экспрессирующихся в других типах клеток (аналогичный результат был получен и для клеток миокарда пациентов с патогенными вариантами в гене *LMNA*) [44].

Белок, кодируемый геном *LMNA*, регулирует экспрессию широкого спектра генов посредством взаимодействия с ламин-ассоциированными доменами. LAD охватывают порядка 20% генома, включая регионы локализации белок-кодирующих и некодирующих генов, причем LAD существенно перераспределяются в кардиомиоцитах при ДКМП, вызванной патогенными вариантами в гене *LMNA* [41]. При ДКМП в клетках миокарда зарегистрировано меньше LAD и значительная их часть была специфична по сравнению с таковыми в непораженном органе. Ламин-ассоциированные домены в целом связаны с повышенным

уровнем метилирования CpG-сайтов и подавлением экспрессии генов, но регистрируются различия по паттерну метилирования ДНК (гипо-/гиперметилирование) между кардиомиоцитами при ДКМП и кардиомиоцитами без патологии, что определяет дифференциальную экспрессию белок-кодирующих генов и генов некодирующих РНК при разных функциональных состояниях [41].

Кроме того, при наличии патогенных мутаций в гене *LMNA* нарушается связывание кодируемого им белка самостоятельно или в комплексе с ламин-ассоциированным полипептидом 2 альфа (*LAP2α*) с ДНК эухроматина, что может приводить к изменению экспрессии генов (как это, в частности, показано для генов *CREBBP*, *PPP2R2B*, *BMP4* и *BMP7*), дисрегуляции некоторых метаболических путей (WNT/β-катенин или TGFβ-BMP), вследствие чего может развиваться ДКМП [40].

На модельных животных и плюрипотентных стволовых клетках установлено, что при наличии патогенных мутаций в гене *LMNA* уже на мезодермальной стадии регистрируют нарушения дифференцировки стволовых клеток и дилатацию сердец эмбрионов [45]. В клетках, гетерозиготных по мутации H222P гена *LMNA* (*LMNA*^{H222P/+}), снижена экспрессия мезодермального кардиогенного гена (*Mesp1*), участвующего в эпителиально-мезенхимальном переходе эпибластных клеток, а также экспрессия *Snai1* и *Twist* (для *Mesp1* и *Twist* наблюдали уменьшение гистоновой метки H3K4me1), что приводило к нарушению дифференцировки кардиомиоцитов. В то же время ингибирование лизин-специфической деметилазы 1 (LSD1), деметилирующей H3K4me1, улучшало эпигенетический ландшафт мезодермальных клеток *Lmna*^{H222P/+} и со-

кратительную способность кардиомиоцитов. Более того, ингибирование LSD1 у беременных или новорожденных мышей предотвращало кардиомиопатию у гомозиготных по данной мутации (*Lmna*^{H222P/H222P}) потомков и взрослых особей соответственно [45, 46].

В целом полученные к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что белковые продукты генов КМП вовлечены в эпигенетические процессы, которые могут быть значимы для развития патологического процесса при различных формах патологии.

МОДИФИКАЦИЯ ГИСТОНОВ И РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ ХРОМАТИНА В МИОКАРДЕ ПРИ КАРДИОМИОПАТИЯХ

Модификации гистонов (ацетилирование, метилирование и др.) влияют на конформацию хроматина, определяя тем самым доступность ДНК для различных регуляторных молекул (например, транскрипционных факторов), и выступают своего рода первым уровнем эпигенетической регуляции. Изменение характера модификации гистонов в кардиомиоцитах были зарегистрированы при развитии различных КМП — ДКМП, ГКМП, ИКМП и РКМП [9, 47–50].

В исследовании С.А. Koczog с соавт. [47] при проведении скрининга десяти модификаций гистона H3 (пять ацетилированных и пять диметилированных) выявлены четыре модификации, которые были значительно изменены в образцах миокарда при ДКМП: диметилирование по 4-му лизину гистона H3 (H3K4me2) уменьшилось на 58%, диметилирование по 79-му лизину (H3K79me2) увеличилось на 350%, ацетилирование по 14-му лизину (H3K14ac) уменьшилось на 66%, по 27-му лизину (H3K27ac) — увеличилось на 280%. В другом исследовании в образцах тканей миокарда левого желудочка мужчин, страдающих сердечной недостаточностью (СН) из-за ДКМП, установлено снижение более чем на 45% метки активного промотора H3K4me3 по сравнению с образцами миокарда контрольной группы, представленной мужчинами, умершими не по причине патологии сердца (по уровню меток H3K27ac, H3K4me1 и H3K27me3 образцы не различались) [50]. Интересно, что в этом исследовании у одного индивида, первоначально отнесенного к контрольной группе, уровень метки активного промотора H3K4me3 в кардиомиоцитах был близок к таковому у пациентов с ДКМП, и при повторном детальном анализе клинических данных у него выявлено умеренное снижение фракции выброса левого желудочка (37%), что позволило заподозрить развившуюся бессимптомную сердечную недостаточность или скрытую форму КМП. Таким образом, данная модификация гистона — триметилирование 4-го остатка лизина гистона H3 (H3K4me3) —

оказалась информативной для выявления патологического фенотипа.

Некоторое несоответствие в полученных результатах в отношении модификаций гистонов в процитированных выше работах [47, 50] может быть связано с включением в исследование пациентов с различными мутациями в генах (сведения в статьях не приведены), так как мутации могут быть значимы для формирования специфичности модификаций гистонов [9], а также различий по эпигенетически значимым клинико-анамнестическим данным включенных в исследование индивидов (таким как возраст, прием лекарственных препаратов, наличие сопутствующих патологий и др.) [51, 52].

Несмотря на то что по интегральному показателю для H3K27ac и H3K27me3 в исследовании С.Ф. Liu с соавт. [50] различий выявлено не было, при метаанализе (при расширении выборки за счет данных, представленных в базе GEO) на уровне отдельных регионов в ткани миокарда между пациентами с ДКМП, осложненной СН, и умершими от несердечных причин зарегистрированы различия по 46 166 и 10 950 дифференциально-обогащенным H3K27ac и H3K4me3 регионам соответственно. Установлено, что различия по ацетилированию и метилированию гистонов между миокардом левого желудочка пациентов с ДКМП и непораженными образцами сердца влияют на специфичность структуры и доступность хроматина, определяя тем самым возможность связывания регуляторов транскрипции с энхансерами и промоторами генов, включая гены, ассоциированные с сердечной недостаточностью [50].

При ГКМП выявлены не только изменения эпигенетического статуса гистонов (которые влияют на уровень экспрессии генов), но и зависимость этих изменений от типа патогенных вариантов в гене КМП, в частности в гене *MYBPC3*. Так, с использованием H3K27ac ChIP-seq, RNA-seq и протеомного анализа между тканями миокарда пациентов с ГКМП, имеющих патогенные варианты в гене *MYBPC3*, приводящие к укорочению кодируемого данным геном белка, и тканями миокарда доноров без гипертрофии выявлены 9310 дифференциально ацетилированных областей гистонов, 2033 дифференциально экспрессирующихся генов и 441 дифференциально экспрессирующийся белок [9]. По отношению к аллелю дикого типа средний уровень ацетилирования гистонов в гене *MYBPC3* у носителей патогенных вариантов с.2373dupG, с.2827C>T и с.927-2A>G составил 50, 25 и 66.6% соответственно, а среднее отношение экспрессии мРНК *MYBPC3* с указанными мутациями — 6.7, 19.7 и 43.4% соответственно. Таким образом, тип мутационных изменений может оказывать влияние на особенности эпигенетических модификаций гистонов и соответственно на

уровень экспрессии генов КМП в аллель-специфичной манере.

В ряде исследований установлено, что изменение уровня метилирования/ацетилирования гистонов согласуется с изменением уровня экспрессии ферментов, обеспечивающих данный процесс, а также наблюдается их взаимодействие с генами КМП и кодируемыми ими белками. М.Е. Repin с соавт. [48] показали, что гистонлизин-N-метилтрансфераза EZH2, катализирующая метилирование гистона 3 по лизину 27 (способна моно-, ди- и триметилировать Lys-27 гистона H3 с образованием H3K27me1, H3K27me2 и H3K27me3 соответственно), при ИКМП в ткани левого желудочка является эпигенетическим регулятором дифференциальной экспрессии генов, значимых для метаболического перепрограммирования при данной КМП [37, 48]. Так, у пациентов с ИКМП в миокарде уровень экспрессии данного фермента увеличен в 2 раза по сравнению с неишемической КМП, в результате между этими группами пациентов различия по уровню метилирования регистрировали для 61 233 CpG-сайтов (12.6% от числа исследованных CpG-сайтов).

Снижение уровня H3K4me3 в миокарде при ДКМП коррелирует со снижением экспрессии гена *SMYD1*, кодирующего H3K4-специфичную лизинметилтрансферазу [50]. У мышей с РКМП, вызванной мутацией p.Arg193His в гене *cTnI* (аналог *TNNI3* у человека), зарегистрировано взаимодействие *cTnI* с гистонтрансметилазой *SMYD1* и гистондеацетилазой *HDAC1*, уровень связывания которых увеличивался в области промотора гена фосфодиэстеразы 4d (*PDE4d*), что приводило к усилению ацетилирования лизина 4 и лизина 9 гистона 3, снижению триметилирования лизина 4 гистона 3 в промоторной области данного гена, вследствие чего происходило снижение уровня экспрессии *PDE4d* в кардиомиоцитах [49]. Примечательно, что вариант *cTnI*^{Arg193His} обладает повышенной связывающей способностью с *HDAC1* по сравнению с *cTnI* дикого типа, тем самым вовлекаясь в регуляцию экспрессии *PDE4D* [42]. Авторы процитированного исследования заключили, что *cTnI*^{Arg193His} как белок миофибрилл может действовать в качестве регулятора экспрессии гена эпигенетическим образом. С другой стороны, выявлено, что *HDAC1* участвует в регуляции экспрессии самого *cTnI* путем ацетилирования H3K4 и H3K9 в промоторных областях данного гена, открывая тем самым доступ для транскрипционного фактора *GATA4* [53]. На мышинных моделях показано, что деацетилазы гистонов класса II (в частности, *HDAC9*) действуют как чувствительные к сигналам стресса супрессоры программы транскрипции, управляющей гипертрофией сердца и сердечной недостаточностью [54].

Модифицирующие хроматин белки, такие как ацетилтрансфераза p300, фактор ремоделирования нуклеосом Brg1, гистондеацетилазы (*HDAC*) и поли(АДФ-рибоза)полимераза (*PARP*), участвуют в регуляции экспрессии генов в период онтогенеза и при развитии патологий, в том числе и в регуляции ответа на воздействие неблагоприятных факторов [10, 55, 56]. Ацетилтрансфераза p300 играет важную роль как в развитии сердца в период эмбриогенеза, так и в поддержании экспрессии генов, специфичной для разных камер сердца [10]. При нарушении регуляции p300 в ответ на сигналы прогипертрофического и профиброгенного стресса наблюдали повышенное рекрутирование p300 к нескольким генам (включая гены, кодирующие факторы транскрипции), усиление ацетилирования специфических лизинов в гистонах и факторах транскрипции, изменение организации хроматина и повышение экспрессии “гипертрофических” генов и генов фиброгенеза [10].

В ответ на патологический стресс у мышей в кардиомиоцитах усиливается экспрессия Brg1, G9a/Glp (гистонметилтрансфераза) и Dnmt3 (ДНК-метилтрансфераза), что приводит к сборке репрессивного хроматина (маркированного метилированными H3K9 и CpG-сайтами) гена *Myh6* и соответственно к снижению его экспрессии и к нарушению сердечных сокращений [5]. У человека в гипертрофированном миокарде также регистрируется активация комплекса BRG1–G9a/GLP–DNMT3, что коррелирует с метилированием H3K9/CpG, репрессией *MYH6* и развитием кардиомиопатии [5].

То, что модификации гистонов могут отражать развитие патологического процесса при КМП или даже выступать в качестве причины патологии сердца, подтверждается экспериментальными и клиническими наблюдениями [50, 57–59]. Так, у мышей при разрушении в кардиомиоцитах Brg1, G9a или Dnmt3 стираются репрессивные хроматиновые метки и подавляется экспрессия гена *Myh6*, что снижает иницированную стрессом дисфункцию сердца [5]. На клеточных и животных моделях показано, что фармакологическая или генетическая нормализация активности p300, нарушенной воздействием прогипертрофического и профиброгенного стресса, может предотвратить или остановить прогрессирование патологических процессов в сердце, в том числе гипертрофии и фиброза миокарда [10]. Применение MPT0E014, являющегося ингибитором *HDAC*, способствовало улучшению сократительной способности и ослаблению структурного ремоделирования сердца крыс при ДКМП, вызванной изопроterenолом [59]. При этом в случае ингибирования *HDAC* у крыс с ДКМП регистрировали не только функциональные изменения со стороны сердца (укорочение фракции выброса, уменьшение конечного диастолического и систолического

го диаметра левого желудочка), но и кардиологически значимые изменения на биохимическом уровне (более низкий уровень предсердного натрийуретического пептида (ANP), рецептора первого типа ангиотензина 2 (AT1R), трансформирующего фактора роста (TGF)- β и белка CaMKII δ по сравнению с крысами с сердечной недостаточностью). У мышей специфичные для миокарда делеции генов *HDAC1* и *HDAC2* приводят к неонатальной летальности, сопровождающейся сердечными аритмиями и ДКМП [60], а гена *HDAC3* — к развитию гипертрофии в 3–4-х месячном возрасте [61].

Эпигенетическая дисрегуляция как основа развития ДКМП была указана J.L. Theis с соавт. [57], описавшими редкий случай рецессивной формы ДКМП, вызванной мутацией в гене *GATAD1*, в GATA-домене цинкового пальца 1. *GATAD1* является компонентом хроматинового белкового комплекса, специфически взаимодействующего с эпигенетической меткой — H3K4Me3 (триметилирование четвертого остатка лизина на гистоне 3), роль которой в сердечной недостаточности была установлена на основе уникального эпигенетического профиля в миокарде левых желудочков пациентов с ДКМП по сравнению с нормальной тканью сердца (цит. по [57]). Наконец, у пациентов с ДКМП после имплантации вспомогательного механического устройства левого желудочка регистрировали не только значительное обратное ремоделирование функции левого желудочка, но и изменение эпигенетического статуса кардиомиоцитов (в том числе посредством активации H3K9 метилтрансферазы и супрессии деметилазы H3K9) [62].

Следует отметить, что модификация гистонов и ремоделирование хроматина, регистрируемые при КМП, являются не изолированными событиями, а запускают каскад других изменений на эпигенетическом, транскрипционном, протеомном и метаболомном уровнях. При этом важно также принимать во внимание и другие эпигенетические процессы, которые вовлечены в патогенез КМП, в том числе — метилирование ДНК.

МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК В КЛЕТКАХ МИОКАРДА ПРИ КАРДИОМИОПАТИЯХ

Метилирование ДНК — процесс, значимый для ремоделирования хроматина и регуляции экспрессии генов, условно можно отнести ко второму уровню эпигенетической регуляции. Модификации гистонов и метилирование ДНК могут изменять экспрессию как независимо, так и совместно, а также могут быть взаимозависимы [63–66].

О значении метилирования ДНК в развитии патологий сердца свидетельствуют данные о динамике уровня экспрессии ключевых ферментов, участвующих в этом процессе, при изменении

функционального состояния миокарда. Так, в миокарде при сердечной недостаточности, развивающейся у пациентов с ДКМП, обструктивной ГКМП и ишемической КМП, регистрировалась повышенная экспрессия ДНК-метилтрансфераз, ответственных за метилирование ДНК *de novo*: *DNMT3A* (в 1.3 раза) и *DNMT3B* (в 2.1 раза), тогда как уровень экспрессии *DNMT1* не изменялся [65]. В другом исследовании, выполненном на модельных животных, показано, что уровень ДНК-метилтрансферазы 1 (*Dnmt1*) в сердце здоровых крыс снижается с возрастом, но его повышение регистрировали в мышинной модели ДКМП/СН, индуцированной адриамицином, и в модели ГКМП/СН, развивающейся вследствие перегрузки давлением [67]. Авторы процитированного исследования отметили также значительное увеличение экспрессии этого фермента в миокарде у пациентов при ГКМП. При этом на культурах клеток установлено, что ингибирование активности DNMT приводит к снижению глобального уровня метилирования ДНК и блокировке повышенной экспрессии нескольких генов ГКМП, таких как *Myh7*, *Gata4*, *Mef2c*, *Nfatc1*, *Myh7b*, *Tnni3* и *Bnp* [68].

Изменение уровня экспрессии генов, продукты которых участвуют в модификациях гистонов и метилировании ДНК, также должны сопровождаться эпигенетическими модификациями кодирующих их генов. Например, гипометилирование гистоновой ацетилазы *HDAC9* зарегистрировано у кардиохирургических пациентов с тяжелой ишемической болезнью сердца и крайними фенотипическими проявлениями сердечной недостаточности (ИКМП) [69].

Изменение уровня метилирования ДНК в миокарде при КМП показано на модельных объектах и для человека не только в отношении генов, продукты которых вовлечены в эпигенетические процессы. Дифференциация по уровню метилирования ДНК установлена между миокардом в норме и при различных формах КМП (чаще изучалась ДКМП): регистрировались как уникальные паттерны метилирования CpG-сайтов, так и различия по уровню их метилирования в геноме в целом и (чаще) на уровне отдельных CpG-сайтов (ДМС) или их скоплений — регионов (ДМР) (табл. 2; Приложение). Большинство исследований выполнено на ткани миокарда пациентов с терминальной стадией поражения сердца (сердечной недостаточностью), развившейся вследствие различных КМП. Кроме миокарда человека, статус метилирования ДНК анализировался в отдельных типах клеток — фибробластах и индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (иПСК) [66], клетках периферической крови человека [69, 75, 76], а также на модельных объектах [82, 83].

Таблица 2. Метилирование ДНК в образцах миокарда и клетках крови при КМП у человека и модельных животных

Сравниваемые группы (исследованная ткань или клетки)	Статус метилирования ДНК
Человек	
ИКМП – контроль (миокард ЛЖ)	Выявлены 3 ДМГ, связанных с ангиогенезом: <i>AMOTL2</i> (↓ экзон), <i>ARHGAP24</i> (↑ интрон) и <i>PECAM1</i> (↑ 5'UTR)
ДКМП – контроль (миокард ЛЖ)	Двухэтапный анализ метилирования ДНК: 1-й этап – 121 ↑ и 10 ↓ промоторов; 2-й этап – 51 ↑ и 6 ↓ промоторов
ДКМП – контроль (миокард ЛЖ)	Из 90 ДМГ – 1/3 ↑, 2/3 ↓. Изменение уровня метилирования выявлено для генов <i>LY75</i> , <i>ERBB3</i> , <i>HOXB13</i> и <i>ADORA2A</i>
ДКМП (миокард ЛЖ, миокард ПЖ)	1828 ДМС: 1284 ↑ и 544 ↓; 984 ДМГ: 558 ↑ и 426 ↓
Подозрение на первичную ДКМП – контроль (миокард ЛЖ)	42745 ДМС; преобладало гиперметилирование (отношение ↑/↓ = 0.92); после поправки на множественность сравнения: 59 ДМС: 30 ↑ и 29 ↓; результаты по 27 (46%) из 59 локусов были реплицированы в независимых когортах, в том числе в генах <i>LY75</i> , <i>PTGES</i> , <i>CTNNAL1</i> , <i>TNFSF14</i> , <i>MRPL16</i> , и <i>KIF17</i>
Подозрение на первичную ДКМП – контроль (цельная кровь)	35 566 ДМС
ИКМП, терминальная стадия – контроль (лейкоциты крови)	732 ДМР; 21.2% ДМГ локализованы в промоторных областях, 78.8% – в межгенных или внутригенных областях
ИКМП – контроль (миокард ЛЖ, верхушка)	cg11189868 ↑ в гене <i>ASB</i>
СН/обструктивная ГКМП – контроль (миокард, межжелудочковая перегородка ЛЖ)	5 ДМР: 4 белок-кодирующих гена (3 ↑, 1 ↓), 1 ген нкРНК (↓)
СН/ИКМП – контроль (миокард, межжелудочковая перегородка ЛЖ)	55 ДМР: 51 белок-кодирующий ген (8 ↑, 43 ↓), 5 генов нкРНК (3 ↑, 2 ↓)
СН/ДКМП – контроль (миокард, межжелудочковая перегородка ЛЖ)	151 ДМР: 131 белок-кодирующий ген (13 ↑, 118 ↓), 17 генов нкРНК (3 ↑, 14 ↓)
СН/ИКМП – СН/ишемическая КМП (миокард ЛЖ, верхушка)	61 233 ДМ CpG-сайтов, в т.ч. проксимальнее (1.5 тпн) промотора гена – 11 946 CpG, в теле гена – 9 211 CpG, в 5'UTR – 5 244 CpG, в 3'UTR – 228 CpG
СН/ДКМП – контроль (миокард ЛЖ, верхушка)	ДМ 22 871 (4%) из 644 354 областей экзонов, локализованных в регионах 8 631 (14%) из 60 153 кодирующих и некодирующих генов; ДМ 13 223 из 394 247 (3%) зондов; ДМ 706 пар интрон–экзон для 630 генов и 650 пар экзон–интрон для 564 генов
ДКМП – контроль (кардиомиоциты из ЛЖ)	Доля mC+ (5-метилцитозин) ДНК кардиомиоцитов при ДКМП выше, чем в контроле, для других типов клеток сердца различий не выявлено; повышенное метилирование ядерной ДНК в кардиомиоцитах наблюдалось преимущественно в гетерохроматиновых районах
СН/ИКМП – контроль (кровь)	68 ДМР, из них 48 расположены в теле генов, 25 – рядом с энхансерами; ДМ ↓: 19 белок-кодирующих генов и 4 гена нкРНК; ДМ ↑: 19 белок-кодирующих генов, 12 генов нкРНК
Члены двух семей с ДКМП и разными мутациями в гене <i>LMNA</i> (гетерозиготы, семья № 1 с.357-2A>G и семья № 2 р.Arg335Trp) – контроль (фибробласты, иПСК)	Нет различий по среднему значению уровня метилирования CpG-сайтов, но они регистрировались на уровне отдельных CpG. Выявлены как общие, так семейно-специфичные ДМС. Специфичность метилирования ДНК по всему геному больше зависит от принадлежности к семье (один тип мутаций), чем от пола

Таблица 2. Окончание

Сравниваемые группы (исследованная ткань или клетки)	Статус метилирования ДНК
ДКМП – контроль (миокард ЛЖ)	В крови и миокарде пациентов установлены значимые отличия в метилировании генов (<i>PKM</i> , <i>PFKM</i> , <i>HK1</i> , <i>LDHA</i> , <i>DLST</i> , <i>OGDH</i> , <i>ACO1</i> , <i>SUCLA2</i> , <i>SUCLG2</i> и <i>SUCLG1</i>), продукты которых связаны с участвующими в гликолизе и цикле лимонной кислоты метаболитами (их уровни повышены до 5.7 раз в сыворотке крови при ДКМП)
ДКМП – контроль (миокард ЛЖ)	1122 ↑, 1314 ↓ генов (при $ FC \geq 1.5$); после поправки на множественность сравнения: 285 ↑ и 321 ↓ ген (при $ FC \geq 1.5$ и $p < 0.05$)
Модельные животные	
Мышиная модель МУВРС3-ассоциированной ДКМП (миокард)	Анализировали 5mC и 5hmC в миокарде мышей с мутантным генотипом (<i>tt</i>): 400 генов ↑, 557 ↓; 755 генов – гипергидроксиметилированы, 1267 – гипогидроксиметилированы. Различия по 5mC и 5hmC регистрировали в саркомерных генах, в т.ч. в <i>Myh7</i> и <i>Myh6</i> (5mC↓ и 5hmC↓), <i>Acta1</i> (5mC↓ и 5hmC↓). Различия по уровням 5mC и 5hmC показаны для локусов некодирующих транскриптов (miR-370, miR-544, DANCER, miR-30c-1, miR-29a и др.)
Мыши с СН после хронического ограничительного стресса – контроль (миокард)	3252 ДМР ($q \leq 0.05$): 37.3% – в интронах, 32.6% – в межгенных регионах, 14.3% – в экзонах, 9.4% – в области 2 тпн выше сайта начала транскрипции, 3.1% – в 5'UTR, 1.94% – в области 2 тпн ниже сайта терминации транскрипции и 1.3% – в 3'UTR. 343 ДМС ($q \leq 0.001$): 308 ↑ (89.8%), 35 ↓

Примечание. Таблица составлена по [47, 48, 65, 66, 69–83]. В качестве контроля для сравнения с образцами миокарда пациентов с различными формами КМП использованы образцы миокарда умерших от причин, не связанных с изучаемой патологией. СН – сердечная недостаточность, ЛЖ – левый желудочек, ПЖ – правый желудочек, 5mC – 5-метилцитозин, 5hmC – 5-гидроксиметилцитозин, ДМ – дифференциальное метилирование, ДМС – дифференциально метилированный CpG-сайт, ДМР – дифференциально метилированный регион, ДМГ – дифференциально метилированные гены, FC – кратность различий, нкРНК – некодирующие РНК. Стрелками ↓ и ↑ отмечены направления изменения уровня метилирования ДНК (гипометилирование и гиперметилирование) в пораженных органах по сравнению с контролем.

Некоторые особенности в изменении уровня метилирования ДНК зарегистрированы при наличии патогенных вариантов в гене *LMNA* (мутации в сайте сплайсинга с.357-2A>G и миссенс-мутации p.Arg335Trp) у членов двух семей с ДКМП, различающихся патологическими фенотипами – с поздним началом и ранней манифестацией в сочетании с брахидактилией (синдром рука–сердце IV) соответственно [66]. Несмотря на то что в целом были характерны близкие оценки по среднему уровню метилирования ДНК в фибробластах и индуцированных плюрипотентных клетках, полученных от пациентов с данными мутациями в гене *LMNA* и от здоровых индивидов, различия наблюдали при анализе отдельных CpG-сайтов. Наибольшие различия по уровню метилирования зарегистрированы для CpG-сайтов с промежуточным уровнем метилирования (30–60%) в контроле. Профиль метилирования ДНК зависел как от наличия/отсутствия, так и от типа мутации в гене *LMNA*. Причем дифференциально метилированные регионы (ДМР) фибробластов были обогащены дистальными регуляторными функциями и транскрипционно репрессированным хроматином, а также ассоциированы с гена-

ми, связанными с соответствующими патологическими фенотипами, специфичными для разных мутаций и разных профилей метилирования ДНК [66]. Примечательно, что выявленные в данном исследовании горячие точки внутрисемейных эпимутаций, локализованных рядом с дифференциально экспрессируемыми генами, в большинстве случаев были расположены вне LAD, перераспределенных у пациентов с *LMNA*-ассоциированной ДКМП. С учетом приведенных выше данных можно заключить, что ген *LMNA* и кодируемый им белок вовлечены в эпигенетическую регуляцию на разных уровнях. Кроме того, данные настоящего исследования свидетельствуют в пользу предположения, что не только патогенные мутации (ген, в котором произошла мутация, ее тип), но и эпигенетические модификации важны для формирования патологического фенотипа.

Большинство исследований, в которых анализировался статус метилирования ДНК в миокарде у пациентов с КМП, проводились без учета патогенных вариантов в генах заболевания. Кроме того, различия в экспериментальных подходах, методах анализа и в уровне рассмотрения (отдельные CpG-сайты, CpG-островки, регионы

хромосом/генов и т.д.) затрудняют прямое сопоставление результатов, полученных разными авторами даже в случае изучения одной и той же КМП (табл. 2; Приложение). С этой точки зрения к числу наиболее интересных исследований в области эпигенетики кардиомиопатий можно отнести работу N. Glezeva с соавт. [65], в которой приведены результаты сравнительного анализа метилирования ДНК и уровня экспрессии генов между тканями межжелудочковой перегородки сердца для трех этиологически различных типов сердечной недостаточности (при обструктивной ГКМП, ДКМП, ишемической КМП) и тканей непораженного сердца. В общей сложности были выявлены около 200 уникальных ДМР при данных патологиях: при обструктивной ГКМП специфичный уровень метилирования ДНК установлен для пяти геномных регионов (в т.ч. в регионе четырех белок-кодирующих генов и одного гена нкРНК), при ДКМП — для 151 региона (в т.ч. в регионе 131 белок-кодирующего гена и 17 генов нкРНК) и при ИКМП — для 55 регионов (включают 51 белок-кодирующий ген и пять генов нкРНК). Например, при ДКМП гиперметилированные регионы выявлены вблизи генов *KRT5*, *TBX2*, *MRPL44*, *BRAF*, *MIR23B*, *MIR27B*, *MIR24-1*, гипометилированные — вблизи *CYR61*, *ACSL1*, *CTGF*, *COL3A1*, *KDM5B*, *DENND5A*, *SMAD2*, *COL19A1*, *MMP2*, *WNT11*, *FBLN2*, *MIR21*, *MIR23B*, *MIR27B*, *PVT1*; при ГКМП гиперметилированными были *HEY2*, *MSR1*, *MFSD2B*, гипометилированными — *MUC5B* и *PVT1*. Для ряда генов наблюдалось однонаправленное изменение метилирования при разных КМП: при ишемической и дилатационной кардиомиопатиях для *KRT5* и кластера генов *MIR23B*, *MIR27B*, *MIR24-1* было характерно гиперметилирование, для *CYR61*, *ACSL1*, *CTGF* — гипометилирование, а для гена нкРНК *PVT1* гипометилирование было выявлено при всех изученных КМП.

Для ишемической и дилатационной КМП отмечалась близость (но не идентичность) некоторых ДМР, выявленных в двух исследованиях [69, 72]. В некоторых случаях были подтверждены полученные результаты при проведении репликативных исследований и/или при сопоставлении своих результатов с ранее опубликованными данными. Так, В. Meder с соавт. [75] в репликативном исследовании подтвердили статус дифференциального метилирования 27 из 59 CpG-сайтов между клетками миокарда пациентов с ДКМП и здоровых индивидов и установили гены с однонаправленным изменением метилирования при ДКМП, полученные разными авторскими коллективами, в частности гипометилированный статус был характерен для генов *PTGES*, *CTNNAL1*, *MRPL16*, гиперметилированный — для генов *LY75*, *TNFSF14*, *KIF17*.

Что касается других исследований, то даже при изучении одних и тех же типов кардиомиопатий

(ДКМП или ИКМП) полученные оценки уровня метилирования ДНК в миокарде трудно сопоставимы, вследствие не только различий в использованных методических подходах, но и в связи с разными решаемыми задачами. В то же время можно сделать ряд обобщений по результатам исследований, посвященных сравнению статуса метилирования ДНК в клетках миокарда от пациентов с КМП и в миокарде донорских сердец (без патологии) (табл. 2; Приложение).

Во-первых, при КМП регистрируются изменения статуса метилирования ДНК если не на тотальном уровне (в среднем), то на уровне отдельных регионов/CpG-сайтов/генов.

Во-вторых, при развитии КМП формируются специфические паттерны метилирования ДНК. Например, для ДКМП в миокарде уникальными были 29044 пика метилирования, для нормы — 654 пика, и только 9632 пика были общими для этих двух состояний [47].

В-третьих, наблюдаются противоречия по оценкам преобладающего статуса метилирования ДНК (гипо-, гиперметилирование). Некоторые исследователи отмечали, что для ДКМП характерен в среднем более высокий уровень метилирования (121 промотор генов был гиперметилирован) в образцах миокарда, чем в образцах миокарда без КМП (10 промоторов генов были гиперметилированы) [47]. Преобладание гиперметилирования выявили среди 42745 дифференциально метилированных CpG-сайтов в миокарде левого желудочка у пациентов с подозрением на ДКМП при оценке без поправки на множественность сравнения, но практически равная их представленность установлена при введении поправки [75] (табл. 2; Приложение).

Кроме того, в одних исследованиях регистрируют преобладание гиперметилированных, в других — гипометилированных участков ДНК. Например, при ДКМП в миокарде к ДМР в разных исследованиях относили: 59 CpG-сайтов (30 из которых были гипометилированы) [75]; 57 промоторов генов (51 был гиперметилирован и 6 — гипометилированы) [47] и т.д. (табл. 2; Приложение). Разная представленность гипо- и гиперметилированного состояния показана как для белок-кодирующих генов, так и для генов нкРНК. Например, в ткани миокарда пациентов с ИКМП среди дифференциально метилированных регионов генов гипометилированными были 19 белок-кодирующих генов (в том числе ген гистон-деацетилазы 9 — *HDAC9*) и четыре гена нкРНК, а гиперметилированными — 19 белок-кодирующих генов и 12 генов нкРНК [69].

В-четвертых, измененный характер метилирования ДНК затрагивает как межгенные регионы, так и внутригенные участки [66, 70, 78, 79]. Если метилирование ДНК в регионе промотора гена

может влиять на уровень его экспрессии, то в других участках гена этот процесс может сказываться на сплайсинге РНК. W.T. Gi с соавт. [78] установили связь метилирования интронной ДНК и использования фланкирующих экзонов при транскрипции, которые были специфичны для пациентов с ДКМП и здорового контроля. Такая зависимость была выявлена для многих регионов генома (для 22871 из 644354 (или 4%) экзомных областей, расположенных в 8631 (15%) из 60153 белок-кодирующих генов и генов нкРНК), но к числу наиболее интересных находок авторы отнесли наблюдения в локусе титина (в гене *TTN* известны мутации, приводящие к развитию различных форм КМП [43]): выявлены реципрокные изменения метилирования ДНК и его влияния на сплайсинг мРНК в кодируемой титин-антисмысловой нкРНК (*TTN-ASI*) при ДКМП (положительная корреляция между показателем PSI и уровнем метилирования) по сравнению с контролем (отрицательная корреляция между показателем PSI и уровнем метилирования). Эти наблюдения, по мнению авторов [78], свидетельствуют также о вовлеченности регуляторных нкРНК (в частности *TTN-ASI*) в патогенез кардиомиопатий. Изменение уровня метилирования ДНК в регионах интронов генов, связанных с ДКМП, также регистрировали на модельных объектах, подвергшихся хроническому стрессу [83].

В-пятых, ДМР затрагивают различные регуляторные элементы, включая промоторы белок-кодирующих генов и генов нкРНК, сайты активных меток транскрипции, активаторов, репрессоров, энхансеров [65, 69, 71, 72, 75]. Так, в когорте кардиохирургических пациентов с тяжелой многосудистой ишемической болезнью сердца и крайними фенотипическими проявлениями сердечной недостаточности в крови зарегистрирован измененный статус метилирования 68 хромосомных регионов, среди которых 48 ДМР были локализованы внутри гена, а 25 — располагались рядом с энхансерными регионами [69].

Наконец, измененный статус метилирования ДНК в ряде случаев коррелировал с уровнем экспрессии генов [65, 71, 75], но зависимость экспрессии генов от уровня метилирования ДНК не всегда была однозначной [65, 66, 72–74, 81, 84]. В целом при сравнении уровня экспрессии генов и метилирования их промоторов в миокарде у пациентов с ДКМП были выявлены четыре функциональные группы [47]: 1) повышение метилирования ДНК — повышение экспрессии генов; 2) повышение метилирования ДНК — понижение экспрессии генов; 3) понижение метилирования ДНК — повышение экспрессии генов; 4) понижение метилирования ДНК и снижение экспрессии генов. Иными словами, наряду с ожидаемой обратной зависимостью между уровнем метилирования ДНК и уровнем экспрессии генов во мно-

гих исследованиях установлены несоответствия между данными процессами (повышенный уровень экспрессии при гиперметилировании и пониженный — при гипометилировании). Так, на основании сопоставления данных из репозитория Gene Expression Omnibus (GEO) в миокарде левого желудочка пациентов с ДКМП по сравнению с непораженной тканью были выявлены как дифференциально метилированные (285 генов были гиперметилированы, 321 ген — гипометилирован), так и дифференциально экспрессируемые гены (171 ген с повышенным и 136 с пониженным уровнем экспрессии), но только для 20 из них наблюдали различия и по уровню метилирования ДНК, и по уровню экспрессии генов [81]. С.А. Koczog с соавт. [47] установили 75 генов с гиперметилированной ДНК в регионе промотора, но с повышенным уровнем экспрессии в миокарде левого желудочка у пациентов с ДКМП. Несмотря на то что у пациентов с идиопатической ДКМП и у крыс при моделировании данной патологии уровень экспрессии гена *TBX20* в ткани миокарда правого желудочка был выше в 8.9 раза и коррелировал с диагностическими эхо-кардиографическими параметрами, различий по уровню метилирования данного гена зарегистрировано не было [84].

Некоторые исследователи отметили различную связь между метилированием и экспрессией генов при разных типах КМП. При существенном гиперметилировании ДНК в области кластера *MIR23B/MIR27B/MIR24-1* в миокарде при ИКМП и ДКМП только в группе с ИКМП экспрессия *miR-24-1* была значительно снижена (в 0.81 раза), по другим микроРНК различий не зарегистрировано; но для *miR-155* наблюдали согласованное изменение метилирования ДНК (гипометилирование) и увеличение экспрессии (выше в 1.63 раза) у пациентов с ИКМП [65]. М.Е. Pepin с соавт. [48] выявили четкую и значимую обратную корреляцию между идентифицированными 211 ДМС в регионе промотора и экспрессией 124 генов в миокарде пациентов с ИКМП, но не у пациентов с неишемической сердечной недостаточностью.

Для объяснения несогласованности изменения уровня метилирования ДНК региона промотора и экспрессии генов (повышение экспрессии при гиперметилировании и понижение экспрессии при гипометилировании) высказывались разные предположения. Так, между левым (пораженным ДКМП) и правым (нормальные ткани) желудочками были выявлены дифференциально метилированные и дифференциально экспрессируемые гены [74]. Однако почти для 50% (469 из 984 генов) регистрировались несогласованность данных по метилированию ДНК и уровню экспрессии, и на основании анализа функциональных сетей авторы данного исследования предположили, что влияние метилирования ДНК на регуляцию

экспрессии генов контролируется функциональным контекстом метаболической подсети, куда вовлекаются гены [74]. J. Naas с соавт. [72] показали, что положительная связь экспрессии гена *ADORA2A* и его метилирования может быть объяснена эффектами сайтов репрессии, в частности в области гипометилированных CpG-островков были выявлены сайты связывания транскрипционного репрессора CTCF (одного из ключевых эпигенетических регуляторов при различных заболеваниях человека).

Для объяснения наблюдаемой несогласованности между статусом метилирования ДНК и экспрессией генов в миокарде у пациентов с ДКМП и патогенными мутациями в гене *LMNA* высказано предположение, что статус метилирования ДНК в регионе энхансеров может быть более значимым для регуляции экспрессии генов, чем в регионе промотора [66]. Наконец, одним из возможных механизмов, лежащих в основе несоответствия уровня метилирования ДНК и экспрессии генов, может являться посттранскрипционные модификации мРНК, в частности метилирование аденозина в N6-положении (m6A), что влияет на стабильность транскриптов. В пораженном миокарде при ДКМП регистрируется повышенный уровень m6A в мРНК — обнаружено 1595 метилированных транскриптов, специфичных для заболевания, и только 331 метилированный транскрипт, специфичный для контроля [85]. На клеточных линиях показано, что, управляя процессами метилирования/деметилирования РНК путем манипуляции с экспрессией отвечающих за эти процессы ферментов (Mettl3 и Fto соответственно) можно управлять функциональным состоянием клеток [85].

В целом можно заключить, что изменение статуса метилирования ДНК в миокарде регистрируется при различных КМП и представляется важным установить функциональную значимость данного процесса. Можно выделить несколько факторов, свидетельствующих о важности изменения профиля метилирования ДНК в патогенезе КМП.

На мышинных моделях показано, что в процессе развития ДКМП происходят значительные эпигенетические изменения (метилирование ДНК), особенно в интронных областях генов [82, 83]. Так, при хроническом стрессе у мышей наряду с ремоделированием сердца в сторону сердечной недостаточности (регистрировались дилатация желудочков, истончение стенок камер и снижение сократимости миокарда) и развитием аритмии изменялся статус метилирования генов (31 регион, 19 генов, из них 11 генов были гиперметилированы), которые связаны с дилатационной КМП (например, ген десмина), а также с адренергическим сигнальным путем кардиомиоцитов [83]. Несмотря на то что не установлено различий по

суммарному уровню метилирования, всего выявлены 3252 ДМР, значительная часть из которых может обладать регуляторным потенциалом [83]. При этом в ходе развития патологического процесса наблюдают изменение уровня метилирования генов КМП, как это было показано для *Myh6* и *Myh7* [5]. На модельных объектах установлено, что эти гены характеризуются разнонаправленными изменениями метилирования ДНК в миокарде в онтогенезе: для *Myh6* уровень метилирования снижался с 45.9% на стадии E12.5 до 32.1% в сердце взрослых особей и возрастал до 59.9, 54.5 и 53.8% через 2, 7 и 14 дней соответственно после стрессорного воздействия перегрузкой давлением сердца посредством хирургического сужения аорты; CpG-сайты гена *Myh7* не были метилированными в сердцах плодов, были умеренно метилированными в сердцах здоровых взрослых и редко метилированными в сердцах особей, подвергнутых стрессу [5].

Изменение уровня метилирования ДНК также регистрировалось между тканями правого и левого желудочков у пациентов с ДКМП: зарегистрировано более 1800 ДМС в основном в слабо метилированных областях, соответствующих проксимальным участкам промотора, которые в сильно пораженных участках сердца были гиперметилированы [73]. Уровень метилирования генов в ткани сердца изменяется не только при развитии ДКМП, но и в зависимости от тяжести ее течения, причем эпигенетический статус меняется для адаптивных/дисадаптивных путей при развитии сердечной недостаточности [72]. Гиперметилирование ДНК в кардиомиоцитах (но не в других типах клеток сердца) при ДКМП и значимая связь этого процесса с функциональными параметрами сердца и параметрами ремоделирования левого желудочка позволили некоторым авторам сделать заключение о патофизиологической значимости метилирования ДНК при сердечной недостаточности [79].

Показано также, что изменение характера метилирования ДНК затрагивает гены, функционально связанные с деятельностью сердца [66, 69, 73, 74]. Так, 62 ДМР, общих для членов семей с ДКМП и разными мутациями в гене *LAMIN*, были ассоциированы с генами, значимыми для развития сердца [66]. При ДКМП установлены 517 ДМС в ткани сердца, которые влияли на уровень экспрессии генов, большинство из которых были задействованы в метаболических путях, связанных с развитием сердца и функционированием мышц [75]. Среди ключевых метаболических путей, значимо обогащенных дифференциально метилированными генами в миокарде при ИКМП, были “Организация хроматина: метилирование лизина 5 гистона H3” (снижено метилирование промотора, 42 гена), “Сердечная проводимость: транспорт кальция” и “Сокращение мышц: тропомио-

зин 2 и легкие цепи миозина” (в обоих случаях повышен уровень метилирования генов — 25 и 33 гена соответственно) [69].

Кроме того, измененный статус метилирования ДНК некоторых генов коррелировал с клинически значимыми при КМП параметрами (такими как фракция выброса левого желудочка (ЛЖ), ударный объем, конечный систолический и диастолический диаметр ЛЖ и др.) [77, 79].

Таким образом, на модельных объектах, на образцах миокарда и других клеток/тканей пациентов показано, что при развитии КМП различной этиологии специфически меняется статус метилирования ДНК; уровень и рисунок метилирования ДНК могут определяться этиологическим фактором КМП, типом мутаций, стадией патологического процесса; метилирование ДНК затрагивает разные регионы генов (экзоны, интроны) и генома (регионы промоторов и энхансеров), которые по-разному влияют на уровень экспрессии генов; уровень метилирования ДНК не всегда согласуется с уровнем экспрессии генов, что указывает на многокомпонентность эпигенетической регуляции реализации генетической программы.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДАННЫХ ПО МОДИФИКАЦИИ ГИСТОНОВ И МЕТИЛИРОВАНИЮ ДНК В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

К настоящему времени накоплены данные по специфичности эпигенетических маркеров, регистрируемых на уровне модификации гистонов и метилирования ДНК в миокарде при различных КМП, что вызывает интерес для поиска диагностических маркеров и разработки на их основе новых подходов к лечению КМП [31]. Специфические модификации гистонов описаны для разных КМП: для ДКМП — H3K4me3, H3K9me2, H3K9me3, H3K79me3; для ГКМП — H3K9me2; для РКМП — H3K4Ac, H3K9Ac, H3K4me3; для АКМП — H3K4me3, H3K4me2, H3K9Ac, H3K9me2, H3K9me3, за которые отвечают специфичные ферменты (EP300, G9A, HDAC1, HDAC2, DOT1L, SMYD1) и именно они могут выступать в качестве мишеней для разработки лекарственных препаратов (цит. по [31]). Так, ингибирование HDAC1 рассматривается в качестве перспективного терапевтического подхода при ИКМП, LSD1 — при ламинопатиях, в том числе — ДКМП, HDAC4 — для предотвращения нарушенного ремоделирования у пациентов с сердечной недостаточностью и др. [45, 56, 86–88]. При ингибировании метилирования ДНК с помощью 5-азациитидина (5-аза) у гипертензивной линии крыс (SHR) значительно улучшились эхокардиографические параметры, связанные с гипертрофией и диастолической дисфункцией, на основании чего сделано заключение о потенциальной возможности исполь-

зования этого эпигенетического модификатора в качестве варианта лечения патологий сердца, связанных с гипертрофией и фиброзом [89].

Что касается специфичности метилирования ДНК в миокарде при различных КМП, то несмотря на выявленные паттерны метилирования ДНК, позволяющие дифференцировать как различные формы патологии, так и пациентов с КМП от здоровых индивидов (табл. 2; Приложение), диагностическая значимость данного показателя ограничена. Одной из причин является ткане- и клеточная специфичность данных эпигенетических модификаций генома. Например, хорошо известно о специфичности профилей метилирования ДНК в ткани миокарда при различных КМП. М.Е. Рерин с соавт. [48] заключили, что данные метилома ДНК сердца лучше, чем данные транскриптома, дифференцируют ишемическую КМП от других типов КМП (в частности, от ДКМП). Однако миокард является труднодоступным и соответственно неудобным материалом для диагностики. Поэтому перспективным представляется поиск таких эпигенетических маркеров в образцах крови. Например, в исследовании В. Meder с соавт. [75] у пациентов с ДКМП выявлены общие для миокарда и лейкоцитов крови измененные паттерны метилирования ДНК некоторых генов: для *B9D1* и *DCLK1* было характерно гипометилирование, а для *NTM* — гиперметилирование. Интерес с диагностической точки зрения могут привлекать также маркеры, для которых дифференциальное метилирование ДНК показано в разных работах или устойчивые оценки были получены при проведении репликативных исследований (*LY75*, *PTGES*, *CTNNAL1*, *TNFSF14*, *MRPL16* и *KIF17*), но на настоящий момент такие данные немногочисленны [75]. В то же время выявление дифференциального метилирования регионов и специфичных модификаций гистонов при разных КМП может способствовать поиску новых (кандидатных) молекулярных маркеров и биохимических процессов, значимых для патогенеза заболеваний [47, 65, 69, 76].

Однако как при поиске диагностических маркеров на основании модификации гистонов и метилирования ДНК, так и при разработке лекарственных препаратов следует принять во внимание несколько моментов. Во-первых, данные эпигенетические модификации динамичны, они изменяются с возрастом, могут зависеть от пола и реагировать как на широкий спектр внешнесредовых воздействий, так и эндогенных изменений. В частности, курение, масса тела, коморбидность (сочетанные патологии), прием лекарственных препаратов могут влиять на различные эпигенетические показатели, включая модификацию гистонов и статус метилирования ДНК [51, 52, 90–92]. Во-вторых, ни метилирование ДНК, ни модификации гистонов не являются самостоятельными факторами, а

действуют во взаимодействии как между собой, так и с другими эпигенетическими маркерами (включая различные нкРНК) [93–96]. В-третьих, несмотря на большой интерес к проблеме изучения профиля метилирования ДНК и модификаций гистонов в тканях при КМП, эти исследования еще не в полной мере раскрывают все многообразие как общих, так и специфических патогенетических путей, определяющих развитие данных заболеваний сердца.

В целом можно заключить, что модификации гистонов и метилирование ДНК действительно могут рассматриваться в качестве перспективных маркеров с точки зрения улучшения диагностики и разработки новых терапевтических подходов для различных форм КМП. Однако требуется расширение исследований для того, чтобы полученные в данной области знания были использованы в практике.

Таким образом, для фенотипически различных форм КМП характерны специфичность как модификаций гистонов, так и метилирования ДНК в миокарде и клетках крови. В то же время из-за клинической гетерогенности КМП, большого арсенала методов и подходов, применяемых для изучения данных эпигенетических событий, полученные результаты все еще являются фрагментарными и необходимо дальнейшее накопление данных, в том числе на уровне эпигенома, транскриптома и эпитранскриптома с использованием омиксного анализа единичных клеток миокарда у человека и модельных животных. Кроме того, важным представляется рассмотрение эпигенетических модификаций в комплексе, во взаимосвязи разных эпигенетических событий, в том числе и с участием регуляторных РНК.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования № 122020300041-7.

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. Jimenez J., Rentschler S.L. Transcriptional and epigenetic regulation of cardiac electrophysiology // *Pediatr. Cardiol.* 2019. V. 40. № 7. P. 1325–1330. <https://doi.org/10.1007/s00246-019-02160-w>
2. Yu J., Zeng C., Wang Y. Epigenetics in dilated cardiomyopathy // *Curr. Opin. Cardiol.* 2019. V. 34. № 3. P. 260–269. <https://doi.org/10.1097/HCO.0000000000000616>
3. Schiano C., Benincasa G., Franzese M. et al. Epigenetic-sensitive pathways in personalized therapy of major cardiovascular diseases // *Pharmacol. Ther.* 2020. V. 210. P. 107514. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107514>
4. Napoli C., Coscioni E., de Nigris F., Donatelli F. Emergent expansion of clinical epigenetics in patients with cardiovascular diseases // *Curr. Opin. Cardiol.* 2021. V. 36. № 3. P. 295–300. <https://doi.org/10.1097/HCO.0000000000000843>
5. Han P., Li W., Yang J. et al. Epigenetic response to environmental stress: Assembly of BRG1-G9a/GLP-DNMT3 repressive chromatin complex on Myh6 promoter in pathologically stressed hearts // *Biochim. Biophys. Acta.* 2016. V. 1863. № 7. Pt. B. P. 1772–1781. <https://doi.org/10.1016/j.bbamer.2016.03.002>
6. De Majo F., Calore M. Chromatin remodelling and epigenetic state regulation by non-coding RNAs in the diseased heart // *Noncoding RNA Res.* 2018. V. 3. № 1. P. 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.ncrna.2018.02.003>
7. Zhou Q., Yu B., Anderson C. et al. LncEGFL7OS regulates human angiogenesis by interacting with MAX at the EGFL7/miR-126 locus // *Elife.* 2019. V. 8. P. e40470. <https://doi.org/10.7554/eLife.40470>
8. Yu J., Yang Y., Xu Z. et al. Long Noncoding RNA ahit protects against cardiac hypertrophy through SUZ12 (Suppressor of Zeste 12 Protein Homolog)-mediated downregulation of MEF2A (Myocyte Enhancer Factor 2A) // *Circ. Heart Fail.* 2020. V. 13. № 1. P. e006525. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.119.006525>
9. Pei J., Schuldt M., Nagyova E. et al. Multi-omics integration identifies key upstream regulators of pathomechanisms in hypertrophic cardiomyopathy due to truncating MYBPC3 mutations // *Clin. Epigenetics.* 2021. V. 13. № 1. P. 61. <https://doi.org/10.1186/s13148-021-01043-3>
10. Ghosh A.K. p300 in cardiac development and accelerated cardiac aging // *Aging Dis.* 2020. V. 11. № 4. P. 916–926. <https://doi.org/10.14336/AD.2020.0401>
11. Salemi V.M.C., Mohty D., Altavilla S.L.L. et al. Insights into the classification of cardiomyopathies: past, present, and future directions // *Clinics (Sao Paulo).* 2021. V. 76. P. e2808. <https://doi.org/10.6061/clinics/2021/e2808>
12. McKenna W.J., Maron B.J., Thiene G. Classification, epidemiology, and global burden of cardiomyopathies // *Circ. Res.* 2017. V. 121. № 7. P. 722–730. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.309711>
13. МКБ-11 (Международная классификация болезней 11-го пересмотра). [Electronic resource]. URL: <https://icd11.ru/> Accessed 03.2022.
14. Bhandari B., Quintanilla Rodriguez B.S., Masood W. Ischemic Cardiomyopathy. 2021. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.
15. Arbustini E., Narula N., Tavazzi L. et al. The MOGE(S) classification of cardiomyopathy for clinicians // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2014. V. 64. № 3. P. 304–318. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.05.027>
16. Menon S.C., Michels V.V., Pellikka P.A. et al. Cardiac troponin T mutation in familial cardiomyopathy with variable remodeling and restrictive physiology // *Clin.*

- Genet. 2008. V. 74. № 5. P. 445–454.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2008.01062.x>
17. Webber S.A., Lipshultz S.E., Sleeper L.A. et al. Outcomes of restrictive cardiomyopathy in childhood and the influence of phenotype: Outcomes of restrictive cardiomyopathy in childhood and the influence of phenotype: A report from the Pediatric Cardiomyopathy Registry // *Circulation*. 2012. V. 126. № 10. P. 1237–1244.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.104638>
 18. Lipshultz S.E., Orav E.J., Wilkinson J.D. et al. Wilkinson J.D. et al. Risk stratification at diagnosis for children with hypertrophic cardiomyopathy: Risk stratification at diagnosis for children with hypertrophic cardiomyopathy: An analysis of data from the Pediatric Cardiomyopathy Registry // *Lancet*. 2013. V. 382. № 9908. P. 1889–1897.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61685-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61685-2)
 19. Jefferies J.L., Wilkinson J.D., Sleeper L.A. et al. Cardiomyopathy phenotypes and outcomes for children with left ventricular myocardial noncompaction: Cardiomyopathy phenotypes and outcomes for children with left ventricular myocardial noncompaction: Results from the Pediatric Cardiomyopathy Registry // *J. Card. Fail.* 2015. V. 21. № 11. P. 877–884.
<https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2015.06.381>
 20. Lee T.M., Hsu D.T., Kantor P. et al. Pediatric cardiomyopathies // *Circ. Res.* 2017. V. 121. № 7. P. 855–873.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309386>
 21. Pérez-Palma E., Gramm M., Nürnberg P. et al. Simple ClinVar: An interactive web server to explore and retrieve gene and disease variants aggregated in ClinVar database // *Nucl. Acids Res.* 2019. V. 47. № W1. P. W99–W105.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkz411>
 22. Комиссарова С.М., Ринейская Н.М., Чакова Н.Н., Ниязова С.С. Смешанный фенотип: некомпактный миокард левого желудочка и гипертрофическая кардиомиопатия // *Кардиология*. 2020. Т. 60. № 4. С. 137–145.
<https://doi.org/10.18087/cardio.2020.4.n728>
 23. Blagova O., Alieva I., Kogan E. et al. Mixed hypertrophic and dilated phenotype of cardiomyopathy in a patient with homozygous in-frame deletion in the *MyBPC3* gene treated as myocarditis for a long time // *Front. Pharmacol.* 2020. V. 11. P. 579450.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2020.579450>
 24. Cipriani A., Perazzolo Marra M., Bariani R. et al. Differential diagnosis of arrhythmogenic cardiomyopathy: Phenocopies versus disease variants // *Minerva Med.* 2021. V. 112. № 2. P. 269–280.
<https://doi.org/10.23736/S0026-4806.20.06782-8>
 25. Mattesi G., Cipriani A., Bause B. et al. Arrhythmogenic left ventricular cardiomyopathy: Genotype-phenotype correlations and new diagnostic criteria // *J. Clin. Med.* 2021. V. 10. № 10. P. 2212.
<https://doi.org/10.3390/jcm10102212>
 26. Wang J., Li W., Han Y., Chen Y. Different clinical presentation and tissue characterization in a monozygotic twin pair with *MYH7* mutation-related hypertrophic cardiomyopathy // *Int. Heart J.* 2019. V. 60. № 2. P. 477–481.
<https://doi.org/10.1536/ihj.18-167>
 27. Frade A.F., Laugier L., Ferreira L.R. et al. Myocardial infarction-associated transcript, a long noncoding RNA, is overexpressed during dilated cardiomyopathy due to chronic Chagas disease // *J. Infect. Dis.* 2016. V. 214. № 1. P. 161–165.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jiw095>
 28. Mazurek S., Kim G.H. Genetic and epigenetic regulation of arrhythmogenic cardiomyopathy // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2017. V. 863. № 8. P. 2064–2069.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.04.020>
 29. Mansueto G., Benincasa G., Della Mura N. et al. Epigenetic-sensitive liquid biomarkers and personalised therapy in advanced heart failure: a focus on cell-free DNA and microRNAs // *J. Clin. Pathol.* 2020. V. 73. № 9. P. 535–543.
<https://doi.org/10.1136/jclinpath-2019-206404>
 30. Calderon-Dominguez M., Belmonte T., Quezada-Feijoo M. et al. Emerging role of microRNAs in dilated cardiomyopathy: evidence regarding etiology // *Transl. Res.* 2020. V. 215. P. 86–101.
<https://doi.org/10.1016/j.trsl.2019.08.007>
 31. Pagiatakis C., Di Mauro V. The emerging role of epigenetics in therapeutic targeting of cardiomyopathies // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 16. P. 8721.
<https://doi.org/10.3390/ijms22168721>
 32. Ke X., Lin Z., Ye Z. et al. Histone deacetylases in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2021. V. 12. P. 679655.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2021.679655>
 33. Mittal A., Garg R., Bahl A., Khullar M. Molecular mechanisms and epigenetic regulation in diabetic cardiomyopathy // *Front. Cardiovasc. Med.* 2021. V. 8. P. 725532.
<https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.725532>
 34. Scolari F.L., Faganello L.S., Garbin H.I. et al. A systematic review of microRNAs in patients with hypertrophic cardiomyopathy // *Int. J. Cardiol.* 2021. V. 327. P. 146–154.
<https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2020.11.004>
 35. Guo Y., Feng X., Wang D. et al. Long non-coding RNA: A key regulator in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy // *Front. Cardiovasc. Med.* 2021 V. 8. P. 655598.
<https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.655598>
 36. Ntelios D., Georgiou E., Alexouda S. et al. A critical approach for successful use of circulating microRNAs as biomarkers in cardiovascular diseases: The case of hypertrophic cardiomyopathy // *Heart Fail. Rev.* 2022. V. 27. № 1. P. 281–294.
<https://doi.org/10.1007/s10741-021-10084-y>
 37. ClinGen [Electronic resource]. URL: <https://clinicalgenome.org/> Accessed 03.2022.
 38. UniProt [Electronic resource]. URL: <https://www.uniprot.org/> Accessed 03.2022.
 39. Gherardi S., Bovolenta M., Passarelli C. et al. Transcriptional and epigenetic analyses of the DMD locus reveal novel cis-acting DNA elements that govern muscle dystrophin expression // *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* 2017. V. 1860. № 11. P. 1138–1147.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2017.08.010>
 40. Zhang X., Shao X., Zhang R. et al. Integrated analysis reveals the alterations that LMNA interacts with euchro-

- matin in *LMNA* mutation-associated dilated cardiomyopathy // Clin. Epigenetics. 2021. V. 13. № 1. P. 3. <https://doi.org/10.1186/s13148-020-00996-1>
41. Cheedipudi S.M., Matkovich S.J., Coarfa C. et al. Genomic reorganization of lamin-associated domains in cardiac myocytes is associated with differential gene expression and dna methylation in human dilated cardiomyopathy // Circ. Res. 2019. V. 124. № 8. P. 1198–1213. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.314177>
 42. Zhao W., Qian Lu, Luo J. et al. Cardiac troponin I R193H mutant interacts with HDAC1 to repress phosphodiesterase 4D expression in cardiomyocytes // Genes Dis. 2020. V. 8. № 4. P. 569–579. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2020.01.004>
 43. Simple ClinVar [Electronic resource]. URL: <https://simple-clinvar.broadinstitute.org/> Accessed 03.2022.
 44. Shah P.P., Lv W., Rhoades J.H. et al. Pathogenic *LMNA* variants disrupt cardiac lamina-chromatin interactions and derepress alternative fate genes // Cell Stem Cell. 2021. V. 28. № 5. P. 938–954.e9. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.12.016>
 45. Guénantin A.C., Jebeniani I., Leschik J. et al. Targeting the histone demethylase LSD1 prevents cardiomyopathy in a mouse model of laminopathy // J. Clin. Invest. 2021. V. 131. № 1. P. e136488. <https://doi.org/10.1172/JCI136488>
 46. Johnston J.R., Selgrade D.F., McNally E.M. Epigenetic reprogramming to prevent genetic cardiomyopathy // J. Clin. Invest. 2021. V. 131. № 1. P. e143684. <https://doi.org/10.1172/JCI143684>
 47. Koczor C.A., Lee E.K., Torres R.A. et al. Detection of differentially methylated gene promoters in failing and nonfailing human left ventricle myocardium using computation analysis // Physiol. Genomics. 2013. V. 45. № 14. P. 597–605. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00013.2013>
 48. Pepin M.E., Ha C.M., Crossman D.K. et al. Genome-wide DNA methylation encodes cardiac transcriptional reprogramming in human ischemic heart failure // Lab. Invest. 2019. V. 99. № 3. P. 371–386. <https://doi.org/10.1038/s41374-018-0104-x>
 49. Zhao W., Wu X., Wang Z. et al. Epigenetic regulation of phosphodiesterase 4d in restrictive cardiomyopathy mice with cTnI mutations // Sci. China Life Sci. 2020. V. 63. № 4. P. 563–570. <https://doi.org/10.1007/s11427-018-9463-9>
 50. Liu C.F., Abnoui A., Bazeley P. et al. Global analysis of histone modifications and long-range chromatin interactions revealed the differential cistrome changes and novel transcriptional players in human dilated cardiomyopathy // J. Mol. Cell. Cardiol. 2020. V. 145. P. 30–42. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2020.06.001>
 51. Zhang W., Qu J., Liu G.H., Belmonte J.C.I. The ageing epigenome and its rejuvenation // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2020. V. 21. № 3. P. 137–150. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0204-5>
 52. Pal S., Tyler J.K. Epigenetics and aging // Sci. Adv. 2016. V. 2. № 7. P. e1600584. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600584>
 53. Yang B., Zhao H., Dong R. MiR-449 improves cardiac function by regulating HDAC1 and cTnI // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 2020. V. 24. № 24. P. 12827–12835. https://doi.org/10.26355/eurev_202012_24184
 54. Zhang C.L., McKinsey T.A., Chang S. et al. Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy // Cell. 2002. V. 110. № 4. P. 479–488. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00861-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00861-9)
 55. Han P., Hang C.T., Yang J., Chang C.P. Chromatin remodeling in cardiovascular development and physiology // Circ. Res. 2011. V. 108. № 3. P. 378–396. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.224287>
 56. Hohl M., Wagner M., Reil J.C. et al. HDAC4 controls histone methylation in response to elevated cardiac load // J. Clin. Invest. 2013. V. 123. № 3. P. 1359–1370. <https://doi.org/10.1172/JCI61084>
 57. Theis J.L., Sharpe K.M., Matsumoto M.E. et al. Homozygosity mapping and exome sequencing reveal GATAD1 mutation in autosomal recessive dilated cardiomyopathy // Circ. Cardiovasc. Genet. 2011. V. 4. № 6. P. 585–594. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.111.961052>
 58. Ai S., Peng Y., Li C. et al. EED orchestration of heart maturation through interaction with HDACs is H3K27me3-independent // Elife. 2017. V. 6. P. e24570. <https://doi.org/10.7554/eLife.24570>
 59. Kao Y.H., Liou J.P., Chung C.C. et al. Histone deacetylase inhibition improved cardiac functions with direct antifibrotic activity in heart failure // Int. J. Cardiol. 2013. V. 168. № 4. P. 4178–4183. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.07.111>
 60. Montgomery R.L., Davis C.A., Potthoff M.J. et al. Histone deacetylases 1 and 2 redundantly regulate cardiac morphogenesis, growth, and contractility // Genes Dev. 2007. V. 21. № 14. P. 1790–1802. <https://doi.org/10.1101/gad.1563807>
 61. Montgomery R.L., Potthoff M.J., Haberland M. et al. Maintenance of cardiac energy metabolism by histone deacetylase 3 in mice // J. Clin. Invest. 2008. V. 118. № 11. P. 3588–3597. <https://doi.org/10.1172/JCI35847>
 62. Ito E., Miyagawa S., Fukushima S. et al. Histone modification is correlated with reverse left ventricular remodeling in nonischemic dilated cardiomyopathy // Ann. Thorac. Surg. 2017. V. 104. № 5. P. 1531–1539. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2017.04.046>
 63. Fan S., Zhang M.Q., Zhang X. Histone methylation marks play important roles in predicting the methylation status of CpG islands // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2008. V. 374. № 3. P. 559–564. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.07.077>
 64. Cedar H., Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms // Nat. Rev. Genet. 2009. V. 10. № 5. P. 295–304. <https://doi.org/10.1038/nrg2540>
 65. Glezeva N., Moran B., Collier P. et al. Targeted DNA methylation profiling of human cardiac tissue reveals novel epigenetic traits and gene deregulation across different heart failure patient subtypes // Circ. Heart. Fail. 2019. V. 12. № 3. P. e005765. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.118.00-5765>
 66. Morival J.L.P., Widyastuti H.P., Nguyen C.H.H. et al. DNA methylation analysis reveals epimutation

- hotspots in patients with dilated cardiomyopathy-associated laminopathies // *Clin. Epigenetics*. 2021. V. 13. № 1. P. 139.
<https://doi.org/10.1186/s13148-021-01127-0>
67. Wu T.T., Ma Y.W., Zhang X. et al. Myocardial tissue-specific *Dnmt1* knockout in rats protects against pathological injury induced by Adriamycin // *Lab. Invest.* 2020. V. 100. № 7. P. 974–985.
<https://doi.org/10.1038/s41374-020-0402-y>
 68. Fang X., Robinson J., Wang-Hu J. et al. cAMP induces hypertrophy and alters DNA methylation in HL-1 cardiomyocytes // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2015. V. 309. № 6. P. C425–C436.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00058.2015>
 69. Bain C.R., Ziemann M., Kaspi A. et al. DNA methylation patterns from peripheral blood separate coronary artery disease patients with and without heart failure // *ESC Heart Fail.* 2020. V. 7. № 5. P. 2468–2478.
<https://doi.org/10.1002/ehf2.12810>
 70. Movassagh M., Choy M.K., Goddard M. et al. Differential DNA methylation correlates with differential expression of angiogenic factors in human heart failure // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 1. P. e8564.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008564>
 71. Koczor C.A., Torres R.A., Fields E.J. et al. Thymidine kinase and mtDNA depletion in human cardiomyopathy: Epigenetic and translational evidence for energy starvation // *Physiol. Genomics*. 2013. V. 45. № 14. P. 590–596.
<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00014.2013>
 72. Haas J., Frese K.S., Park Y.J. et al. Alterations in cardiac DNA methylation in human dilated cardiomyopathy // *EMBO Mol. Med.* 2013. V. 5. № 3. P. 413–429.
<https://doi.org/10.1002/emmm.201201553>
 73. Jo B.S., Koh I.U., Bae J.B. et al. Methylome analysis reveals alterations in DNA methylation in the regulatory regions of left ventricle development genes in human dilated cardiomyopathy // *Genomics*. 2016. V. 108. № 2. P. 84–92.
<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2016.07.001>
 74. Jo B.S., Koh I.U., Bae J.B. et al. Data of methylome and transcriptome derived from human dilated cardiomyopathy // *Data Brief*. 2016. V. 9. P. 382–387.
<https://doi.org/10.1016/j.dib.2016.09.006>
 75. Meder B., Haas J., Sedaghat-Hamedani F. et al. Epigenome-wide association study identifies cardiac gene patterning and a novel class of biomarkers for heart failure // *Circulation*. 2017. V. 136. № 16. P. 1528–1544.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.027355>
 76. Li B., Feng Z.H., Sun H. et al. The blood genome-wide DNA methylation analysis reveals novel epigenetic changes in human heart failure // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2017. V. 21. № 8. P. 1828–1836.
 77. Ortega A., Tarazón E., Gil-Cayuela C. et al. ASB1 differential methylation in ischaemic cardiomyopathy: relationship with left ventricular performance in end-stage heart failure patients // *ESC Heart Fail.* 2018. V. 5. № 4. P. 732–737.
<https://doi.org/10.1002/ehf2.12289>
 78. Gi W.T., Haas J., Sedaghat-Hamedani F. et al. Epigenetic regulation of alternative mRNA splicing in dilated cardiomyopathy // *J. Clin. Med.* 2020. V. 9. № 5. P. 1499.
<https://doi.org/10.3390/jcm9051499>
 79. Watanabe T., Okada H., Kanamori H. et al. *In situ* nuclear DNA methylation in dilated cardiomyopathy: an endomyocardial biopsy study // *ESC Heart Fail.* 2020. V. 7. № 2. P. 493–502.
<https://doi.org/10.1002/ehf2.12593>
 80. Haas J., Frese K.S., Sedaghat-Hamedani F. et al. Energy metabolites as biomarkers in ischemic and dilated cardiomyopathy // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 4. P. 1999.
<https://doi.org/10.3390/ijms22041999>
 81. Liu L., Huang J., Liu Y. et al. Multiomics analysis of transcriptome, epigenome, and genome uncovers putative mechanisms for dilated cardiomyopathy // *Biomed. Res. Int.* 2021. V. 2021. P. 6653802.
<https://doi.org/10.1155/2021/6653802>
 82. Tabish A.M., Arif M., Song T. et al. Association of intronic DNA methylation and hydroxymethylation alterations in the epigenetic etiology of dilated cardiomyopathy // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2019. V. 317. № 1. P. H168–H180.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00758.2018>
 83. Zhang P., Li T., Liu Y.Q. et al. Contribution of DNA methylation in chronic stress-induced cardiac remodeling and arrhythmias in mice // *FASEB J.* 2019. V. 33. № 11. P. 12240–12252.
<https://doi.org/10.1096/fj.201900100R>
 84. Mittal A., Sharma R., Prasad R. et al. Role of cardiac TBX20 in dilated cardiomyopathy // *Mol. Cell. Biochem.* 2016. V. 414. № 1–2. P. 129–136.
<https://doi.org/10.1007/s11010-016-2666-5>
 85. Kmietczyk V., Riechert E., Kalinski L. et al. m6A-mRNA methylation regulates cardiac gene expression and cellular growth // *Life Sci. Alliance*. 2019. V. 2. № 2. P. e201800233.
<https://doi.org/10.26508/lsa.201800233>
 86. Moore J.B. 4th, Zhao J., Keith M.C. et al. The epigenetic regulator HDAC1 modulates transcription of a core cardiogenic program in human cardiac mesenchymal stromal cells through a p53-dependent mechanism // *Stem Cells*. 2016. V. 34. № 12. P. 2916–2929.
<https://doi.org/10.1002/stem.2471>
 87. Williams A.M., He W., Li Y. et al. Histone deacetylase inhibition attenuates cardiomyocyte hypoxia-reoxygenation injury // *Curr. Mol. Med.* 2018. V. 18. № 10. P. 711–718.
<https://doi.org/10.2174/1566524019666190208102729>
 88. Jiang D.S., Yi X., Li R. et al. The histone methyltransferase mixed lineage leukemia (MLL) 3 may play a potential role on clinical dilated cardiomyopathy // *Mol. Med.* 2017. V. 23. P. 196–203.
<https://doi.org/10.2119/molmed.2017.00012>
 89. Watson C.J., Horgan S., Neary R. et al. Epigenetic therapy for the treatment of hypertension-induced cardiac hypertrophy and fibrosis // *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 2016. V. 21. № 1. P. 127–137.
<https://doi.org/10.1177/1074248415591698>
 90. Pepin M.E., Drakos S., Ha C.M. et al. DNA methylation reprograms cardiac metabolic gene expression in end-stage human heart failure // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2019. V. 317. № 4. P. H674–H684.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00016.2019>

91. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types // *Genome Biol.* 2013. V. 14. № 10. P. R115. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-10-r115>
92. Кучер А.Н., Назаренко М.С., Марков А.В. и др. Вариабельность профилей метилирования CpG-сайтов генов микроРНК в лейкоцитах и тканях сосудов при атеросклерозе у человека // *Биохимия.* 2017. Т. 82. Вып. 6. С. 923–933.
93. Forini F., Kusmic C., Nicolini G. et al. Triiodothyronine prevents cardiac ischemia/reperfusion mitochondrial impairment and cell loss by regulating miR30a/p53 axis // *Endocrinology.* 2014. V. 155. № 11. P. 4581–4590. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1106>
94. Mathiyalagan P., Okabe J., Chang L. et al. The primary microRNA-208b interacts with Polycomb-group protein, Ezh2, to regulate gene expression in the heart // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. № 2. P. 790–803. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt896>
95. Harikrishnan K.N., Okabe J., Mathiyalagan P., Khan A.W. et al. Sex-based mHRT methylation chromatinizes MeCP2 in the heart // *iScience.* 2019. V. 17. P. 288–301. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.06.031>
96. Dal-Pra S., Hodgkinson C.P., Mirotsoy M. et al. Demethylation of H3K27 is essential for the induction of direct cardiac reprogramming by miR combo // *Circ. Res.* 2017. V. 120. № 9. P. 1403–1413. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308741>

Epigenetics of Cardiomyopathy: Histone Modifications and DNA Methylation

A. N. Kucher^a and M. S. Nazarenko^{a, *}

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

*e-mail: maria.nazarenko@medgenetics.ru

Cardiomyopathy is clinically and genetically heterogeneous group of pathologies of myocardium that are being actively studied by researchers. It is now generally accepted that, along with genetic factors, epigenetic mechanisms can be significant in both risk for cardiomyopathy and different clinical manifestations of the disease. This article provides an overview of scientific publications devoted to the study of histone modifications and chromatin remodeling, as well as DNA methylation changes in different types of cardiomyopathy. Most of the reports focused on epigenome profiling of myocardium of patients with dilated cardiomyopathy. The development of cardiomyopathy (dilated, hypertrophic, ischemic, arrhythmogenic, and restrictive) is associated with epigenetic changes of myocardium and this leads to gene expression alteration and metabolic pathways imbalance with pathogenetic significance for heart diseases. The genes of cardiomyopathies (*LMNA*, *TNNI3*, *ANKRD1*, *SLC25A4*, *EYA4*, *GATAD1*, *PRDM16*, and *DMD*) are also involved in epigenetic changes of myocardium. Epigenetic modifications, and enzymes that regulate epigenetic processes, are promising for the identification of new molecular markers and metabolic pathways significant for cardiomyopathies, as well as for the development of diagnostic panels and new drugs. At the same time, the high clinical and etiological heterogeneity of cardiomyopathies, a large number of diverse and interrelated epigenetic processes that occur both under physiological conditions and during the pathogenesis of the disease indicate the need to expand epigenetic studies in various forms of cardiomyopathies, including epigenome, transcriptome, and epitranscriptome levels using omics analysis of single cells of myocardium in humans and model animals, as well as in cell lines in disease modeling.

Keywords: cardiomyopathy, histone modifications, DNA methylation, chromatin remodeling.

ОБЗОРНЫЕ И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 575.224.2

РОЛЬ ГЕНА *АТОХ1* В МЕТАБОЛИЗМЕ МЕДИ И В ПАТОГЕНЕЗЕ МЕДЬ-ИНДУЦИРОВАННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

© 2023 г. И. Ж. Жалсанова¹ *, Е. А. Фонова¹, Д. И. Жигалина¹, Н. А. Скрябин¹

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

*e-mail: irina.zhalsanova@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 15.04.2022 г.

После доработки 10.06.2022 г.

Принята к публикации 07.07.2022 г.

Белок АТОХ1 (Antioxidant Protein 1) представляет собой медный металлошаперон человека, который играет важную роль в клеточном гомеостазе меди. Белок ответственен за захват цитозольной меди с CTR1 (транспортер меди 1) и перенос на медные насосы в транс-сети Гольджи к белкам АТР7А и АТР7В. В настоящем обзоре были собраны данные об антиоксидантной роли *АТОХ1*, роли гена в регулировании ангиогенеза и пролиферации раковых клеток, а также роли в патогенезе медь-индуцированных заболеваний – болезни Вильсона–Коновалова и болезни Менкеса.

Ключевые слова: *АТОХ1*, металлошапероны, болезнь Вильсона–Коновалова, болезнь Менкеса.

DOI: 10.31857/S0016675823030128, **EDN:** IQRALQ

Медь (Cu) является важным металлом с высоким окислительно-восстановительным потенциалом, необходимым для большинства биологических систем. Медь обнаружена в различных клетках и тканях, при этом самые высокие концентрации наблюдаются в печени (концентрация около 5 мкг/г) и головном мозге (4–5 мкг/г) [1]. Медь играет роль в клеточном дыхании, антиоксидантной защите, пигментации волос, сетчатки и кожи, гомеостазе железа, образовании соединительной ткани, формировании коллагенового матрикса, передаче сигнала киназы, липолизе и процессинге нейропептидов и имеет решающее значение для выживания всех живых организмов. В организм человека медь поступает в основном с пищей [2]. Потребление данного микроэлемента сильно различается у разных людей в зависимости от выбора продуктов питания и пищевых привычек, а также от факторов окружающей среды. Большинство диет содержат достаточно меди (1–5 мг), чтобы предотвратить дефицит, и недостаточно, чтобы вызвать токсичность [3].

Недостаточное поступление меди в организм приводит к большому числу метаболических нарушений и влияет на окислительно-восстановительный состав клеток. Дефицит меди снижает активность купроферментов и вызывает клеточные патологии, многие проявления которых могут быть связаны, по крайней мере частично, с дефектами механизмов антиоксидантной защиты [4]. Низкие уровни меди и сниженная активность

медь-зависимых ферментов были зарегистрированы при нейродегенеративных заболеваниях.

Однако и избыточное накопление токсично для всех организмов в значительной степени из-за того, что свободные ионы меди реагируют с пероксидом водорода с образованием гидроксильных радикалов, которые могут повредить белки, липиды и нуклеиновые кислоты и т.д. Медь также может изменять структуру и активность различных металлопротеинов, конкурируя с их природными металлами за места связывания. Возникновение дефицита или избытка меди происходит в результате экстремальных диет [5].

МЕТАЛЛОШАПЕРОНЫ

Регуляция меди опосредована медь-зависимыми ферментами, которые широко экспрессируются в клетках и тканях организма. Так, лизил-оксидаза, которая является медьсодержащим белком, сшивает коллаген и эластин, что необходимо для образования соединительной ткани. Церулоплазмин – ферроксидоза, которая содержит более 65% всей меди в организме, участвует в метаболизме железа и во многих окислительно-восстановительных реакциях организма.

Известно, что у эукариот металлоферменты меди обнаружены во многих клеточных локациях, включая цитозоль, митохондрии и клеточную поверхность. В 1991 г. было открыто семейство эукариотических цитоплазматических белков,

связывающих ионы металлов, которые участвуют во внутриклеточном перемещении ионов металлов [1]. Исследования *in vitro* показывали, что большая часть ферментов меди легко усваивает металл без вспомогательных белков, однако эксперименты *in vivo* показали, что требуется наличие дополнительного фактора — шаперонов [6].

Металлошапероны — небольшие растворимые белки, которые доставляют ионы металлов к месту назначения или в промежуточные положения внутри клеток, защищая при этом металлы от случайных участков связывания или вредных реакций. Первое упоминание о металлошаперонах меди датируется 1997 г., до этого не существовало установленных молекул, которые выполняли эту функцию. Металлошапероны отвечают за транспортировку ионов металлов к белкам-мишеням. Так, функция металлошаперона должна быть двойственной — связывание иона металла и перенос иона металла к белку-партнеру или от него. Для связывания иона металла необходим участок хелатирования, а перенос осуществляется посредством специфических белок-белковых взаимодействий [7].

Все выделенные к настоящему времени шапероны меди были впервые идентифицированы в пекарских дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*. В работе 1999 г. М.Е. Portnoy и соавт. выделяли три металлошаперона меди: дрожевой Lys7p (человеческий CCS), который доставляет медь к супероксиддисмутазе 1 (SOD1) в цитозоле; дрожевой и человеческий COX17, которые направляют медь в митохондрии для активации цитохромоксидазы; и дрожевой Atx1p (человеческий HAH1 или ATOX1), который специфически переносит медь по секреторному пути для включения в ферменты меди, предназначенные для клеточной поверхности или внеклеточной среды [8].

Leo W.J. Klomp с соавт. [7] провели скрининг библиотеки кДНК печени человека и выделили гомолог Atx1p млекопитающих, который был назван HAH1 (human ATX homologue 1, сейчас ATOX1). Ген включал 113 пн 5'-нетранслируемой области, 204 пн открытой рамки считывания и 185 пн 3'-нетранслируемой последовательности. В результате РНК-блоттинга была изучена тканеспецифическая экспрессия гена, мРНК была обнаружена во всех исследованных тканях, что подтверждало важную роль данного белка в клеточном гомеостазе меди и антиоксидантной защите [7]. Было показано, что Atox1 млекопитающих защищает клетки от окислительного повреждения, вызванного переизбытком водорода, изменение его уровня влияет на воспалительную реакцию и антиоксидантную защиту, а инактивация, в свою очередь, повышает чувствительность клеток к истощению глутатиона и другим стрессовым факторам [9, 10].

Антиоксидантный протеин ATOX1 — повсеместно экспрессируемый белок, массой 7.4 кДа, состоящий из 68 аминокислот, имеет компактную структуру с ферредоксиноподобной топологией $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$, содержит сайт связывания металла (MBS) и потенциальный сигнал ядерной локализации (NLS), имеет мотив последовательности MxCxxC. Две короткие α -спирали, “покоящиеся” на β -листе, содержат два функциональных остатка Cys, что обычно наблюдается для ферредоксиноподобных малых оксидоредуктаз (рис. 1) [11]. ATOX1 доставляет медь к медным насосам, ATR7A и ATR7B, присутствующим на мембранах секреторных пузырьков и в транс-сети Гольджи, тем самым облегчая снабжение медью различных медь-зависимых оксидоредуктаз, созревающих в секреторных везикулах. ATOX1 образует стабильные гетеродимерные комплексы с медным мостиком со всеми шестью металлсвязывающими доменами ATR7B, расположенными в транс-сети Гольджи, и впоследствии транспортирует к нему медь. Предполагается, что ATOX1 регулирует присутствие меди в белке ATR7B, что, в свою очередь, влияет на внутриклеточную локализацию, посттрансляционную модификацию и каталитическую активность белка [12].

Дальнейшие исследования показали, что доставка меди к супероксиддисмутазе SOD1 (также известную как Cu/Zn-SOD гомодимерный цинк-и медьсодержащий фермент) осуществляется посредством фермента, который впоследствии называли медным шапероном для супероксиддисмутазы — CCS [13]. Человеческий CCS кодируется единственной копией гена на хромосоме 11 и повсеместно экспрессируется во всех исследованных тканях и типах клеток человека. CCS представляет собой многодоменный белок (29 кДа, 274 аминокислоты), который состоит из двух доменов (I и II) [14]. Благодаря гомологичной структуре домена I с ATOX1 CCS и ATOX1 могут напрямую взаимодействовать друг с другом, что в свою очередь, возможно, увеличивает родство меди к активации SOD1. Yuta Hatori с соавт. [15] показывают решающую роль домена I CCS в конкуренции за ограниченный цитозольный пул меди, другими словами ATOX1 способствует транспорту цитозольной меди к секреторному пути, где происходят созревание большинства медных ферментов и удаление избыточной меди, а при дефиците меди CCS активируется и обменивает медь с ATOX1, чтобы выделить металл для созревания SOD1. Домен II гомологичен SOD1, который является белком-мишенью CCS: у него есть сайты связывания металлов для меди и цинка, сходные с SOD1, но лишённые каталитически важных остатков. Домен II необходим для гетеродимеризации с SOD1 и облегчает вставку меди в SOD1. Таким образом, фермент CCS благодаря двум доменам захватывает медь и переносит к SOD1 [15].

COX17 (Cytochrome C Oxidase 17) — белок размером 7 кДа, служит медным шапероном для митохондриальной цитохром С оксидазы (ССО). Митохондриям требуется медь для созревания ССО, которая катализирует терминальную реакцию дыхательной цепи и встроена во внутреннюю мембрану митохондрий. Доставка меди осуществляется с помощью ряда митохондриальных медных шаперонов, включая SCO1 (Synthesis of Cytochrome C Oxidase 1), SCO2 (Synthesis of Cytochrome C Oxidase 2) и COX11 (Cytochrome C Oxidase Copper Chaperone COX11). Белок COX17 наблюдался как в цитозоле, так и в межмембранном пространстве митохондрий (IMS). SCO1 и SCO2 представляют собой гомологичные мембранные белки с тиоредоксиноподобным доменом, обращенным к IMS. COX17 захватывает один ион меди и переносит металл к SCO1 и COX11, которые оба участвуют во встраивании меди в ССО. Известно, что SCO1 получает медь от COX17 в реакции, связанной с переносом электрона, а затем доставляет медь в ССО посредством специфических белок-белковых взаимодействий. SCO2 также получает медь от COX17, но действует как оксидоредуктаза, восстанавливая металл, координирующий остатки Cys ССО, при этом связывание меди с SCO2 значительно облегчает окислительно-восстановительную реакцию [11].

CTR1 (Copper Transporter 1) — высокоаффинный переносчик также известный как SLC31A1, который доставляет медь через плазматическую мембрану. CTR1 существует в плазматической мембране в виде гомотримера с внеклеточным N-концевым участком, тремя трансмембранными спиралями и внутриклеточным C-концом [16].

Таким образом, общая схема метаболизма меди в норме выглядит следующим образом: клетки связывают медь посредством глутатиона, который способствует проникновению меди в клетки за счет облегчения диссоциации меди от высокоаффинного переносчика меди CTR1, или переносчиком двухвалентного металла 1 (DMT1). Белок CTR1 переносит медь из желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) в энтероциты. Далее медь поступает в систему воротной вены и поглощается гепатоцитами. В клетках печени медь включается в церулоплазмин, который секретируется в кровоток для последующего распределения по всему организму. Часть меди включается в состав ферментов гепатоцитов или связывается с металлотионеинами. Примерно 30% меди, поглощенной гепатоцитами, сразу экскретируется через желчь. В клетки всех типов медь поступает через CTR1. Будучи связанной с тиоловыми лигандами, медь перемещается по различным внутриклеточным направлениям, т.е. к медь-зависимым ферментам в цитозоле, митохондриях и просвете везикулярных компартментов. В цитозоле она связывается Cu(I)-шаперонами, которые обеспечивают без-

опасный транспорт и доставку ионов меди к местам формирования купроэнзимов: шаперон CCS участвует в передаче меди к SOD1, шаперон COX17 — в митохондрии к цитохромоксидазе и шаперон ATOX1 — в транс-сети Гольджи к медь-транспортирующим АТФазам А- и Р-типа. В ответ на повышение меди в транс-сети Гольджи активируется фермент АТР7А, что влечет высвобождение меди через воротную вену в печень. АТР7В в свою очередь переносит связанную с церулоплазмином медь в кровь, а также выводит избыток меди в желчь (рис. 2).

Повсеместно экспрессируемый белок ATOX1 кодируется одноименным геном. Ген *ATOX1* (NM_004045.3, NP_004036.1, antioxidant 1 copper chaperone, ранее *HAH1*) кодирует белок транспорта меди ATOX1, расположен на 5-й хромосоме в положении 5q33.1, содержит 4 экзона и 3 интрона. Длины экзонов гена *ATOX1* составляют 59 пн — первый экзон, 76 пн — второй, 171 пн — третий и 136 пн — четвертый. Три интрона в гене *ATOX1* имели длину 6764 пн (интрон 1), 5255 пн (интрон 2) и 3320 пн (интрон 3) [7, 17].

Роль гена *ATOX1* в патогенезе нарушения обмена меди можно рассмотреть в двух направлениях — антиоксидантная защита от окислительных повреждений клеток (например, при канцерогенезе) или транспортное регулирование клеточного гомеостаза меди: 1) недостаточное количество поступающей меди в клетки или 2) избыток и накопление меди в клетках, тканях и органах.

ВЛИЯНИЕ ГЕНА *ATOX1* В ПАТОГЕНЕЗЕ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ПРИ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

Рак представляет собой многофакторную совокупность заболеваний, которые включают неконтролируемый рост клеток с последующей инвазией раковых клеток, диссеминацией и образованием вторичных опухолей в локальных и отдаленных местах [18]. Медь способствует ангиогенезу опухоли, она участвует в реакциях с повышенным окислительно-восстановительным потенциалом, которые приводят к образованию продуктов окисления и окислительному стрессу [19]. Существуют данные, согласно которым раковая ткань и сыворотка раковых больных содержат повышенное количество меди. Медь активирует метаболические и пролиферативные ферменты, повышающие способность раковых клеток к метастазированию, а также может являться диагностическим/прогностическим маркером канцерогенеза [20]. Было отмечено снижение уровня меди в сыворотке во время ремиссии и повышение — при рецидивах, в контексте хронического лимфолейкоза, неходжкинской лимфомы, множественной миеломы и лимфомы Ходжкина, повышение также отмечалось при ретикулокле-

точной саркоме, бронхогенном и плоскоклеточном раке гортани, раке шейки матки, молочной железы, желудка и легких [21]. Существует огромное количество исследований, направленных на разработку медь-специфических хелаторов в качестве средств для подавления этих процессов посредством контроля ангиогенеза. Хелаторы меди удаляют ионы меди из организма, что замедляло рост и метастазирование рака путем ингибирования васкуляризации поражений [22].

Белок ATOX1 обладает активностью фактора транскрипции и играет жизненно важную роль в пролиферации раковых клеток посредством участия в процессах ангиогенеза. Сообщалось, что ATOX1 способствует экспрессии циклина D1 и NADPH-оксидазы p47 phox, что приводит к усилению пролиферации и генерации активных форм кислорода [23]. Jana Arundhati с соавт. указывают на увеличение экспрессии гена *ATOX1* у пациентов с колоректальным раком, а также его значение на метастазирование, и предлагают этот ген в качестве терапевтической мишени в лечении рака прямой кишки [24]. Аналогичные данные показывают исследования в области рака молочной железы, в которых была показана роль гена в метастазировании опухоли. Авторы предлагают использовать анализ уровня экспрессии гена *ATOX1* в качестве потенциального прогностического биомаркера для ER-позитивных подтипов и ранних стадий рака молочной железы [18, 25]. Ген *ATOX1* значительно экспрессировался в образцах пациентов с меланомой, вызванной мутацией в гене *BRAF*. Было установлено, что *ATOX1* необходим для роста меланомы с положительной мутацией *BRAF*, а его генетическая делеция или фармакологическое ингибирование связаны с подавлением активации онкогенного митоген-активируемого протеинкиназного пути (MAPK) [26].

ГЕН *ATOX1* И ДЕФИЦИТ МЕДИ В КЛЕТКАХ ПРИ БОЛЕЗНИ МЕНКЕСА

Болезнь Менкеса (OMIM 309400, болезнь курчавых волос, синдром затылочных рогов, БМ) представляет собой сцепленное с X-хромосомой мультисистемное летальное нарушение метаболизма меди, связанное с мутациями в гене *ATP7A*, характеризующееся ранней задержкой роста, своеобразным оволосением и фокальной мозговой и мозжечковой дегенерацией. Частота заболевания по некоторым исследованиям варьирует от 1 на 40000 до 1 на 354507 населения [27].

Описан широкий спектр клинических проявлений, связанный с нарушением гомеостаза меди вследствие мутаций в гене *ATP7A*. Наиболее часто описывают три клинические группы — болезнь Менкеса, синдром затылочного рога и X-сцепленная дистальная спинальная мышечная атрофия 3-го типа. Помимо основных групп существу-

ют промежуточные формы болезни Менкеса — длительно сохраняющаяся классическая болезнь Менкеса (Long Surviving Menkes), умеренная (Moderate Menkes) и мягкая (Mild Menkes) формы [28].

За счет неспецифических клинических и биохимических признаков в первые дни жизни болезнь Менкеса чаще всего диагностируют после появления выраженных симптомов в возрасте от 6–10 недель. Ярким признаком заболевания является наличие структурных изменений волос — так называемые “курчавые волосы”, представленные повышенной ломкостью волос (trichorexis nodosa) и монилетриксом (веретенообразные волосы). Поздними проявлениями болезни являются слепота, субдуральная гематома, дыхательная недостаточность. Большинство пациентов умирают к трем годам жизни вследствие инфекционных, сосудистых осложнений или от самой неврологической дегенерации.

Патогенный механизм — аномальный метаболизм меди, вызванный мутацией в гене *ATP7A*. Ген *ATP7A* длиной 8.5 тпн расположен в регионе Xq13.3, имеет 23 экзона, кодирует 1500 аминокислот и широко экспрессируется в головном мозге, почках, легких и мышцах [29]. Ген кодирует энергозависимый транспортирующий Cu^{++} альфа-полипептид, который циклически переключается между транспортной сетью Гольджи и плазматической мембраной. Мутации в гене *ATP7A* приводят к накоплению меди в кишечнике и нарушению всасывания меди, что ведет к дефициту меди в организме, в том числе в головном мозге. Мутации могут влиять на синтез белка, стабильность белка, доставку и локализацию, каталитическую активность и посттрансляционные модификации. Предполагается, что в трети случаев болезни Менкеса обнаруживаются новые мутации. На сегодняшний день известно около 170 различных мутаций, влияющих на *ATP7A* [30]. Дефицит меди приводит к снижению активности дофамин- β -гидроксилазы (DBH), которая превращает дофамин в норадреналин (важный нейротрансмиттер в норадреналинергических нейронах), пептидил- α -амидирующая (РАМ) монооксигеназы (необходима для нейрогенеза и выживания нейронов) и приводит к активации N-метил-D-аспаратного рецептора (NMDAR), вызывая дегенеративную потерю нейронов у пациентов с БМ [31].

ATP7A имеет шесть металлосвязывающих доменов, посредством которых происходит связь с медью, домены 1–4 выполняют регуляторную функцию, а также через эти домены происходит взаимодействие между *ATP7A* и *ATOX1*. На мышинных моделях было показано, что разрушение мышинного гомолога *Atox1* приводит к перинатальной смертности и биохимическим аномалиям, сходным с мышинными моделями БМ. Клетки с дефицитом *Atox1* накапливали высокие уровни внут-

риклеточной меди, и метаболические исследования показали, что этот дефект был вызван нарушением клеточного оттока меди. Таким образом, авторы пришли к выводу, что продукты генов *АТОХ1* и *АТР7А* являются неотъемлемой частью транспорта меди у млекопитающих и что мутации в любом из них могут вызывать сходные клинические и биохимические фенотипы [32, 33].

ГЕН *АТОХ1* И ИЗБЫТОЧНОЕ НАКОПЛЕНИЕ МЕДИ В КЛЕТКАХ ПРИ БОЛЕЗНИ ВИЛЬСОНА—КОНОВАЛОВА

Одним из примеров нарушения метаболизма меди по причине избыточного накопления меди в клетках и тканях является такое заболевание как болезнь Вильсона—Коновалова.

Болезнь Вильсона—Коновалова (OMIM 277900, гепатолентикулярная дегенерация, гепатоцеребральная дистрофия, БВК) — тяжелое прогрессирующее наследственное заболевание, передающееся по аутосомно-рецессивному типу. В основе патогенеза БВК лежит нарушение выведения меди из организма, приводящее к избыточному накоплению этого микроэлемента в тканях и сочетанному поражению паренхиматозных органов и головного мозга [34].

Заболевание может быть диагностировано в любом возрасте, чаще это 5–35 лет. У большинства пациентов детского или подросткового возраста с БВК обычно наблюдаются печеночные проявления (небольшие изменения биохимических показателей, печеночная недостаточность). По мере прогрессирования заболевания у пациентов могут проявляться признаки и симптомы хронического заболевания печени, гепатоспленомегалии или цирроза печени [35].

В возрасте до 10 лет нервно-психические симптомы редко наблюдаются у детей, однако у 5–15% детей с печеночными проявлениями также могут быть неврологические симптомы. БВК влияет на ЦНС в основном через дисфункцию экстрапирамидной системы и бульбарный синдром. На ранних стадиях заболевания наиболее частым симптомом является дизартрия (73–91% случаев неврологических проявлений) [36]. Впоследствии появляются двигательные расстройства, такие как тремор, паркинсонизм или непроизвольные движения, возможны дисфункция мозжечка, хорея и гиперрефлексия. Психиатрические симптомы могут варьироваться от поведенческих изменений и расстройств настроения до психозов; кроме того, аффективные расстройства встречаются чаще, чем расстройства психотического спектра [35].

Наиболее известным диагностическим симптомом БВК является кольцо Кайзера—Флейшера, поражающее десцеметову мембрану роговицы. У

пациентов с неврологическими проявлениями в 95% случаев наблюдается кольцо Кайзера—Флейшера, у пациентов с печеночными проявлениями — в 50% [34].

Заболевание вызывается гомозиготными или сложными гетерозиготными мутациями (наличие двух разных мутантных аллелей) в гене *АТР7В*, кодирующем трансмембранную транспортирующую медь АТФазу, которая обеспечивает экскрецию меди в желчь и доставляет медь для функционального синтеза церулоплазмина. В результате мутаций в гене *АТР7В* происходит снижение функциональности фермента и АТФаза теряет способность переносить медь к церулоплазмину. Вследствие этого происходит уменьшение экстракции меди в желчь, перегрузки гепатоцитов и головного мозга медью, что влечет за собой печеночные и неврологические расстройства. В настоящее время выделяют более 800 мутаций в гене *АТР7В*. Большинство из них представляют собой миссенс-мутации, небольшие делеции/инсерции в кодирующей области или мутации сплайс-соединения. “Горячие точки” мутаций существуют, но значительно разнятся среди популяций. Среди европеоидов наиболее распространенной мутацией у пациентов с БВК является мутация Н1069Q (встречается в 30–73% случаев) [37].

На данный момент ген *АТР7В* является единственным идентифицированным геном, мутации в котором приводят к развитию болезни Вильсона—Коновалова. Однако в некоторых исследованиях у пациентов с яркой клинической симптоматикой БВК и с отсутствием двух выявленных мутаций в гене *АТР7В* предполагают существование другого причинного гена, кроме *АТР7В* [38]. Недавние исследования показали, что на клиническую картину БВК помимо мутаций в гене *АТР7В* могут оказывать влияние мутации в так называемых генах-модификаторах. Гены-модификаторы — это группа генов, которые участвуют в патогенезе заболевания и могут как усугублять, так и облегчать фенотипическое действие причинного гена. Среди генов-модификаторов БВК выделяют гены *АТР7А* и *АРОЕ*. Известен спектр генов, которые продуцируют белки, участвующие в метаболизме меди, что приводит к предположению вовлеченности этих генов и в патогенез такого заболевания как БВК, но уже в роли генов-модификаторов — это такие гены как *HFE*, *COMMD1*, *XIAP*, *PRNP*, *MTHFR*, *ESD*, *INO80* [39]. Кроме перечисленных к генам-модификаторам также можно отнести ген *АТОХ1*.

Важным аспектом остается идентификация генетических вариантов *АТОХ1* при болезни Вильсона—Коновалова. Все больше появляется публикаций, посвященных поиску полиморфных вариантов или мутаций, которые могут привести к изменению функции гена *АТОХ1*.

Существует предположение, что возникновение мутаций в гене *ATP7B* у больных БВК, которые влияют на его взаимодействие с *ATOX1* (с.254G>T (p.Gly85Val); с.1475T>C (p.Leu492Ser) и с.1772G>A (p.Gly591Asp)), предполагают важную роль шаперона в патогенезе заболевания [40]. Также прогнозируется, что мутации, приводящие к снижению функции белка *ATOX1*, будут влиять на гомеостаз меди и патогенез БВК, вызывая различные клинические проявления болезни.

Некоторые исследования опровергают связь определенных замен с патогенезом или клиническим полиморфизмом БВК. Так, авторы исследования 2008 г. выдвинули предположение о возможной модифицирующей роли двух полиморфных вариантов (5'UTR-99T>C и 5'UTR-68C>T) в гене *ATOX1*, однако более позднее исследование другого коллектива авторов, проведенное для 112 пациентов с БВК, не показало значимой ассоциации с вариантом 5'UTR-99T>C в гене *ATOX1* [41, 42]. В 2019 г., в Индии был проведен поиск мутаций в гене *ATOX1* у 50 человек с БВК и 60 человек из контрольной группы, и в опубликованных материалах было выдвинуто предположение о выявлении нового кандидатного полиморфизма гена *ATOX1* в качестве модификатора при БВК [43]. Исследователями было идентифицировано четыре новых полиморфизма в гене *ATOX1*, среди которых был и вариант кодирующей области с.40G>A, p.(Gly14Ser). Выявленный вариант p.(Gly14Ser) наблюдался у пациента с БВК с ранним началом заболевания, сниженным уровнем церулоплазмينا в сыворотке и поражением печени и головного мозга, при этом такая клиника отсутствовала у другого пациента с БВК и идентичной мутацией *ATP7B*, но с нормальным *ATOX1*. Кроме того, компьютерный анализ предсказал, что замена p.(Gly14Ser) в критическом мотиве связывания меди (MXCXG14C) белка влияет на белок-белковое взаимодействие, связанное с обменом и переносом меди между *ATOX1* и *ATP7B-MBD4*. К сожалению, нет данных о дальнейших экспериментах проверки влияния данной мутации на патогенез меди, из-за чего сложно сделать однозначный вывод о подтвержденной модифицирующей роли варианта p.(Gly14Ser).

МОДЕЛИ ИССЛЕДОВАНИЯ ПАТОГЕНЕЗА МЕДИ НА ЖИВОТНЫХ

В настоящее время доступно несколько естественных и генетически модифицированных моделей животных для исследования патогенеза и последующей адресной терапии болезни Вильсона—Коновалова. Так, описаны четыре животных модели БВК с дефектами гена *ATP7B*: 1) крысы линии “Long-Evans cinnamon” (LEC), 2) мыши линии “Toxic milk” (tx), 3) трансгенные мыши с нокаутом *Atp7b* и 4) лабрадор-ретривер [44]. Все

животные модели обладают высокой гомологией гена *Atp7b* с геном *ATP7B* человека, что позволяет использовать данных животных в качестве модельных для изучения БВК.

Крысы линии LEC достаточно широко и долго использовались в качестве основных животных моделей БВК. У этих крыс известна сходная делеция гена *Atp7b*, который очень похож на человеческий ген *ATP7B*, что приводит к накоплению избытка меди в печени и одновременному снижению выхода меди в желчь [44–47].

Для мышей линии “Toxic milk” известна только одна точечная мутация Met1386Val в гене *Atp7b*, что приводит к неправильной локализации и потере активности транспорта меди [48–50]. Наблюдаемые биохимические изменения (низкий уровень меди в сыворотке и церулоплазмине) при данном генетическом дефекте подобны биохимическим изменениям у людей с БВК, в связи с чем долгое время именно мыши линии “Toxic milk” служили модельными животными для разработки хелатной терапии, направленной на коррекцию уровня меди [51].

У лабрадора-ретривера мутация *Atp7b* (замена аргинина на глутамин на С-конце) также приводит к избытку накопления меди в печени, что представляет собой еще одну несомненно важную животную модель изучения БВК [52, 53].

Однако крысы линии “Long-Evans cinnamon”, мыши линии “Toxic milk” и лабрадор-ретриверы не использовались в качестве модельных животных для изучения изолированной роли гена *ATOX1* в патогенезе БВК, но использовались как модель *in vivo* для клинических испытаний тех хелаторов, точкой приложения которых является взаимодействие с металлошаперонами, в том числе и *ATOX1*.

Известно, что именно трансгенные мыши являются основным инструментом для изучения физиологической роли переносчиков меди: Ctrl1, Atox1, медного шаперона для Cu/Zn superoxide dismutase (Ccs) и Cox17. Так, в 2001 г. I. Hamza с соавт. [32] проанализировали линию мышей с нокаутом гена *Atox1*. Мыши Atox1(-/-) не развивались сразу после рождения: 45% детенышей умирали до отлучения от груди. У выживших животных наблюдались такие симптомы как задержка роста, дряблость кожи, гипопигментация и судороги из-за перинатального дефицита меди. Дефицит Atox1 у матери заметно увеличивал тяжесть фенотипа Atox1(-/-), что приводило к увеличению перинатальной смертности, а также к серьезной задержке роста и врожденным порокам развития среди выживших потомков Atox1(-/-). Кроме того, клетки с дефицитом Atox1 накапливали высокие уровни внутриклеточной меди, и метаболические исследования показали, что этот дефект был вызван нарушением клеточного оттока меди [32].

Кроме того, проведенное в 2009 г. исследование гомеостаза меди на фибробластах мышей, обработанных siRNA *Atox1*, показало аномальное повышение концентрации меди в клетках [54].

РОЛЬ ГЕНА *АТОХ1* ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ С НАРУШЕНИЕМ МЕТАБОЛИЗМА МЕДИ

Существующее патогенетическое лечение БВК становится более персонализированным при появлении новых данных о мутациях не только в гене *АТР7В*, но и в генах-модификаторах, таких как *АТОХ1*. Основным подходом к лечению БВК является комбинированная терапия, состоящая из выведения повышенного количества меди с использованием хелаторов и последующего ограничения поступления меди с помощью диетотерапии. На сегодняшний день к хелаторам при БВК относят: соли цинка, D-пеницилламин, триентин или триэтилентетрамин (ТЭТА), димеркаптоянтарную кислоту и димеркаптопропансульфоновую кислоту, а также тетратиомолибдаты (ТТМ): тетратиомолибдат аммония и тетратиомолибдат бисхолина. Однако большинство применяемых хелаторов неспецифичны для меди и могут связывать другие металлы даже с более высокой avidностью. Например, триентин предположительно образует комплексы с железом и таким образом может вызывать побочные эффекты, такие как сидеробластная анемия.

Препарату ТТМ уделяется больше внимания, чем другим препаратам, хелатирующим медь, поскольку известна его двойная роль: во-первых, предотвращение образования АФК, происходящих из стабильного неокислительно-активного кластера Cu/ТТМ, и, во-вторых, ингибирование переноса меди в места мишени или инактивация многих медь-зависимых ферментов, важных для клеточного метаболизма (поддержание и пролиферация), путем образования тройных комплексов белок—Cu—ТТМ [55–57].

Ярким примером является связь ТТМ с цитоплазматическим транспортным белком меди *Atox1* с образованием стабильного комплекса ТТМ—*Atox1*. Полученный продукт ингибирует перенос меди в раковые клетки, что требует избытка меди и значительно снижает пролиферацию раковых клеток [20].

Впервые препарат ТТМ использовался в качестве потенциального препарата против меди для лечения БВК еще в 1984 г. [58, 59]. ТТМ известен как Cu-хелаторный препарат на основе серы, который в первую очередь разработан для лечения БВК, а в настоящее время также для лечения нескольких типов рака [60–62].

Несколько моделей на животных и исследования на людях показали, что ТТМ является без-

опасным, хорошо переносимым, антиоксидантным и менее токсичным препаратом [63, 64].

Кроме того, была исследована связь между медью, раком и/или ангиогенезом [65–67]. Основываясь на экспериментальных данных, медь является важным элементом для ангиогенеза во время образования новых кровеносных сосудов, в которых развиваются опухолевые/раковые клетки. И так как повышенный уровень меди является признаком рака, поэтому медь-зависимые ферменты, а также ангиогенные факторы считаются многообещающими терапевтическими мишенями для лечения рака [20, 57, 67].

ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕНА *АТОХ1* В ПАТОГЕНЕЗЕ НАРУШЕНИЙ МЕТАБОЛИЗМА МЕДИ

Наблюдаемое малое количество исследований роли гена *АТОХ1* на модельных системах, как *in vitro*, так *in vivo*, дают определенный задел для дальнейшего изучения гомеостаза меди в норме и патологии. В эпоху развития молекулярно-генетических и цитогенетических технологий наиболее перспективным направлением нам представляется изучение функций гена *АТОХ1* на индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (ИПСК), с возможностью не просто “внести” мутацию в данный ген, но и создать определенные условия для исследования метаболизма меди. Например, изучить изменение функции гена *АТОХ1* при создании определенных экстремальных условий, таких как недостаток или избыток меди в клетке. Существующие единичные работы с использованием подобной модели базировались на работе “здорового” гена *АТОХ1*, без учета генетических вариаций как в самом металлошапероне, так и в генах — акцепторах меди. Так, в 2013 г. Е.В. Магуон и др. провели эксперимент по захвату меди шаперонами *in vivo*, изучая роль глутатиона как связывающего медь посредника [68]. Выдвинутая ими гипотеза гласила, что если шапероны связывают доставленную в клетки медь, то нокаут или сверхэкспрессия шаперонов должны повлиять на начальную скорость поглощения меди, обусловленную переносом в клетки с помощью трансмембранного белка-импортера CTR1. Однако, изучив нокаут и сверхэкспрессию таких шаперонов меди как *АТОХ1* и *ССS*, влияния на начальную скорость меди в клетках линии НЕК-293 обнаружено не было.

Кроме того, например, отмечено явление синергичности генов *АТОХ1* и *АТР7В* при таком вирусном заболевании как лихорадка Зика (вирус Зика из рода *Flavivirus*). Исследование 2021 г. показало, что вирус Зика у человека приводит к подавлению белка АТР7В, что опосредует высвобождение меди и при этом также наблюдается активация механизмов, которые противодействуют

высоким уровням меди, включая синтез медных шаперонов, в том числе *АТОХ1* [69]. Наблюдаемое явление наглядно демонстрирует эффект саморганизации клетки в распределении меди при неблагоприятных обстоятельствах.

Неоднозначность роли гена *АТОХ1* в патогенезе медь-зависимых патологий может быть обусловлена недостаточной изученностью данного гена. Нами были собраны все доступные данные на сегодняшний день, которые свидетельствуют о возможной роли этого гена в развитии заболеваний, обусловленных нарушениями метаболизма меди. Кроме того, накопленные данные указывают на перспективность дальнейших исследований металлошаперонов и их роли в патогенезе обмена меди, в том числе в рамках персонализированной медицины.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ № МК-6225.2021.1.4.

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. Linder M.C. Biochemistry of Copper // Biochem. Copp. Springer US. 1991.
<https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9432-8>
2. Van Den Berghe P.V.E., Klomp L.W.J. New developments in the regulation of intestinal copper absorption // Nutr. Rev. 2009. V. 67. № 11. P. 658–672.
<https://doi.org/10.1111/J.1753-4887.2009.00250.X>
3. Gaetke L.M., Chow-Johnson H.S., Chow C.K. Copper: toxicological relevance and mechanisms // Arch. Toxicol. 2014. V. 88. № 11. P. 1929–1938.
<https://doi.org/10.1007/S00204-014-1355-Y>
4. Korte J.J., Prohaska J.R. Dietary copper deficiency alters protein and lipid composition of murine lymphocyte plasma membranes // J. Nutr. 1987. V. 117. № 6. P. 1076–1084.
<https://doi.org/10.1093/JN/117.6.1076>
5. Leah Harris Z., Gitlin J.D. Genetic and molecular basis for copper toxicity // Am. J. Clin. Nutr. 1996. V. 63. № 5. P. 836–841.
<https://doi.org/10.1093/AJCN/63.5.836>
6. O'Halloran T.V., Culotta V.C. Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. № 33. P. 25057–25060.
<https://doi.org/10.1074/JBC.R000006200>
7. Klomp L.W.J., Lin S.J., Yuan D.S. et al. Identification and functional expression of HAH1, a novel human gene involved in copper homeostasis // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. № 14. P. 9221–9226.
<https://doi.org/10.1074/JBC.272.14.9221>
8. Portnoy M.E., Rosenzweig A.C., Rae T. et al. Structure-function analyses of the ATX1 metallochaperone // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. № 21. P. 15041–15045.
<https://doi.org/10.1074/JBC.274.21.15041>
9. Kelner G.S., Lee M.H., Clark M.E. et al. The copper transport protein Atox1 promotes neuronal survival // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. № 1. P. 580–584.
<https://doi.org/10.1074/JBC.275.1.580>
10. Hatori Y., Clasen S., Hasan N.M. et al. Functional partnership of the copper export machinery and glutathione balance in human cells // J. Biol. Chem. 2012. V. 287. № 32. P. 26678–26687.
<https://doi.org/10.1074/JBC.M112.381178>
11. Hatori Y., Lutsenko S. The role of copper chaperone atox1 in coupling redox homeostasis to intracellular copper distribution // Antioxidants (Basel, Switzerland). 2016. V. 5. № 3.
<https://doi.org/10.3390/ANTIOX5030025>
12. Walker J.M., Tsivkovskii R., Lutsenko S. Metallochaperone Atox1 transfers copper to the NH2-terminal domain of the Wilson's disease protein and regulates its catalytic activity // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. № 31. P. 27953–27959.
<https://doi.org/10.1074/JBC.M203845200>
13. Culotta V.C., Klomp L.W.J., Strain J. et al. The copper chaperone for superoxide dismutase // J. Biol. Chem. Elsevier. 1997. V. 272. № 38. P. 23469–23472.
<https://doi.org/10.1074/JBC.272.38.23469>
14. Petzoldt S., Kahra D., Kovermann M. et al. Human cytoplasmic copper chaperones Atox1 and CCS exchange copper ions *in vitro* // Biometals. 2015. V. 28. № 3. P. 577–585.
<https://doi.org/10.1007/S10534-015-9832-1>
15. Hatori Y., Inouye S., Akagi R. Thiol-based copper handling by the copper chaperone Atox1 // IUBMB Life. Blackwell Publ. Ltd. 2017. V. 69. № 4. P. 246–254.
<https://doi.org/10.1002/iub.1620>
16. Curnock R., Cullen P.J. Mammalian copper homeostasis requires retromer-dependent recycling of the high-affinity copper transporter 1 // J. Cell Sci. 2020. V. 133. № 16.
<https://doi.org/10.1242/JCS.249201>
17. Itoh S., Ha W.K., Nakagawa O. et al. Novel role of antioxidant-1 (Atox1) as a copper-dependent transcription factor involved in cell proliferation // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. № 14. P. 9157–9167.
<https://doi.org/10.1074/JBC.M709463200>
18. Blockhuys S., Wittung-Stafshede P. Roles of copper-binding proteins in breast cancer // Int. J. Mol. Sci. 2017. V. 18. № 4.
<https://doi.org/10.3390/IJMS18040871>
19. Antoniadou V., Sioga A., Dietrich E.M. et al. Is copper chelation an effective anti-angiogenic strategy for cancer treatment? // Med. Hypotheses. 2013. V. 81. № 6. P. 1159–1163.
<https://doi.org/10.1016/J.MEHY.2013.09.035>
20. Denoyer D., Masaldan S., La Fontaine S. et al. Targeting copper in cancer therapy: “Copper That Cancer” //

- Metallomics. 2015. V. 7. № 11. P. 1459–1476.
<https://doi.org/10.1039/C5MT00149H>
21. *Gupte A., Mumper R.J.* Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment // *Cancer Treat. Rev.* 2009. V. 35. № 1. P. 32–46.
<https://doi.org/10.1016/J.CTRV.2008.07.004>
 22. *Doñate F., Juarez J.C., Burnett M.E. et al.* Identification of biomarkers for the antiangiogenic and antitumour activity of the superoxide dismutase 1 (SOD1) inhibitor tetrathiomolybdate (ATN-224) // *Br. J. Cancer.* 2008. V. 98. № 4. P. 776–783.
<https://doi.org/10.1038/SJ.BJC.6604226>
 23. *Wang J., Luo C., Shan C. et al.* Inhibition of human copper trafficking by a small molecule significantly attenuates cancer cell proliferation // *Nat. Chem.* 2015. V. 7. № 12. P. 968–979.
<https://doi.org/10.1038/nchem.2381>
 24. *Jana A., Das A., Krett N.L. et al.* Nuclear translocation of Atox1 potentiates activin A-induced cell migration and colony formation in colon cancer // *PLoS One.* 2020. V. 15. № 1.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0227916>
 25. *Blockhuys S., Brady D.C., Wittung-Stafshede P.* Evaluation of copper chaperone ATOX1 as prognostic biomarker in breast cancer // *Breast Cancer.* 2020. V. 27. № 3. P. 505–509.
<https://doi.org/10.1007/S12282-019-01044-4>
 26. *Kim Y.J., Bond G.J., Tsang T. et al.* Copper chaperone ATOX1 is required for MAPK signaling and growth in BRAF mutation-positive melanoma // *Metallomics.* 2019. V. 11. № 8. P. 1430–1440.
<https://doi.org/10.1039/C9MT00042A>
 27. *Kaler S.G., Ferreira C.R., Yam L.S.* Estimated birth prevalence of Menkes disease and ATP7A-related disorders based on the Genome Aggregation Database (gnomAD) // *Mol. Genet. Metab. Reports.* Elsevier. 2020. V. 24. P. 100602.
<https://doi.org/10.1016/J.YMGMR.2020.100602>
 28. *Horn N., Wittung-Stafshede P.* ATP7A-regulated enzyme metalation and trafficking in the menkes disease puzzle // *Biomedicines.* 2021. V. 9. № 4.
<https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES9040391>
 29. *Vulpe C., Levinson B., Whitney S. et al.* Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase // *Nat. Genet.* 1993. V. 3. № 1. P. 7–13.
<https://doi.org/10.1038/NG0193-7>
 30. *Tümer Z., Möller L.B.* Menkes disease // *Eur. J. Hum. Genet.* 2009. V. 18. № 5. P. 511–518.
<https://doi.org/10.1038/ejhg.2009.187>
 31. *Chen J., Jiang Y., Shi H. et al.* The molecular mechanisms of copper metabolism and its roles in human diseases // *Pflugers Arch.* 2020. V. 472. № 10. P. 1415–1429.
<https://doi.org/10.1007/S00424-020-02412-2>
 32. *Hamza I., Faissat A., Prohaska J. et al.* The metallochaperone Atox1 plays a critical role in perinatal copper homeostasis // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. № 12. P. 6848–6852.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.111058498>
 33. *Liu P.C., Koeller D.M., Kaler S.G.* Genomic organization of ATOX1, A human copper chaperone // *BMC Genet. BioMed Central.* 2003. V. 4. № 1. P. 1–4.
<https://doi.org/10.1186/1471-2156-4-4/TABLES/2>
 34. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению болезни Вильсона–Конова-лова (гепатолентикулярная дегенерация). М., 2015.
 35. *Shribman S., Warner T.T., Dooley J.S.* Clinical presentations of Wilson disease // *Ann. Transl. Med.* 2019. V. 7. Suppl. 2. P. S60.
<https://doi.org/10.21037/ATM.2019.04.27>
 36. *Machado A., Chien H.F., Deguti M.M. et al.* Neurological manifestations in Wilson’s disease: Report of 119 cases // *Mov. Disord.* 2006. V. 21. № 12. P. 2192–2196.
<https://doi.org/10.1002/MDS.21170>
 37. *Баязутдинова Г.М., Шагина О.А., Поляков А.В.* Молекулярный патогенез болезни Вильсона–Конова-лова // *Мед. генетика.* 2017. Т. 16. № 7. С. 18–24.
 38. *Chang I.J., Hahn S.H.* The genetics of Wilson disease // *Handb. Clin. Neurol.* 2017. V. 142. P. 19.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63625-6.00003-3>
 39. *Postigran A.E., Zhalsanova I.Z., Fonova E.A. et al.* Modifier genes as a cause of Wilson–Konovalov disease clinical polymorphism // *Rus. J. Genet.* 2021. V. 57. № 5. P. 522–532.
<https://doi.org/10.1134/S1022795421050094/TABLES/1>
 40. *Hamza I., Schaefer M., Klomp L.W.J. et al.* Interaction of the copper chaperone HAH1 with the Wilson disease protein is essential for copper homeostasis // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. № 23. P. 13363–13368.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.96.23.13363>
 41. *Simon I., Schaefer M., Reichert J. et al.* Analysis of the human Atox 1 homologue in Wilson patients // *World J. Gastroenterol.* 2008. V. 14. № 15. P. 2383–2387.
<https://doi.org/10.3748/WJG.14.2383>
 42. *Bost M., Piguet-Lacroix G., Parant F. et al.* Molecular analysis of Wilson patients: Direct sequencing and MLPA analysis in the ATP7B gene and Atox1 and COMMD1 gene analysis // *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2012. V. 26. № 2–3. P. 97–101.
<https://doi.org/10.1016/J.JTEMB.2012.04.024>
 43. *Kumari N., Kumar A., Pal A. et al.* In-silico analysis of novel p.(Gly14Ser) variant of ATOX1 gene: Plausible role in modulating ATOX1-ATP7B interaction // *Mol. Biol. Rep.* 2019. V. 46. № 3. P. 3307–3313.
<https://doi.org/10.1007/S11033-019-04791-X>
 44. *Reed E., Lutsenko S., Bandmann O.* Animal models of Wilson disease // *J. Neurochem.* 2018. V. 146. № 4. P. 356–373.
<https://doi.org/10.1111/JNC.14323>
 45. *Medici V., Huster D.* Animal models of Wilson disease // *Handb. Clin. Neurol.* 2017. V. 142. P. 57–70.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63625-6.00006-9>
 46. *Wu J., Forbes J.R., Chen H.S. et al.* The LEC rat has a deletion in the copper transporting ATPase gene ho-

- mologous to the Wilson disease gene // *Nat. Genet.* 1994. V. 7. № 4. P. 541–545.
<https://doi.org/10.1038/NG0894-541>
47. Suzuki M., Aoki T. Impaired hepatic copper homeostasis in long-evans Cinnamon rats: Reduced biliary excretion of copper // *Pediatr. Res.* 1994. V. 35. № 5. P. 598–601.
<https://doi.org/10.1203/00006450-199405000-00012>
 48. Rauch H. Toxic milk, A new mutation affecting copper metabolism in the mouse // *J. Hered.* 1983. V. 74. № 3. P. 141–144.
<https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.JHERED.A109751>
 49. La Fontaine S., Theophilos M.B., Firth S.D. et al. Effect of the toxic milk mutation (tx) on the function and intracellular localization of Wnd, the murine homologue of the Wilson copper ATPase // *Hum. Mol. Genet.* 2001. V. 10. № 4. P. 361–370.
<https://doi.org/10.1093/HMG/10.4.361>
 50. Voskoboinik I., Greenough M., La Fontaine S. et al. Functional studies on the Wilson copper P-type ATPase and toxic milk mouse mutant // *Biochem. Biophys. Res.* 2001. V. 281. № 4. P. 966–970.
<https://doi.org/10.1006/BBRC.2001.4445>
 51. Kasai N., Osanai T., Miyoshi I. et al. Clinico-pathological studies of LEC rats with hereditary hepatitis and hepatoma in the acute phase of hepatitis // *Lab. Anim. Sci.* 1990. V. 40. P. 502–505.
 52. Smedley R., Mullaney T., Rumbeiha W. Copper-associated hepatitis in Labrador Retrievers // *Vet. Pathol.* 2009. V. 46. № 3. P. 484–490.
<https://doi.org/10.1354/VP.08-VP-0197-S-FL>
 53. Fieten H., Gill Y., Martin A.J. et al. The Menkes and Wilson disease genes counteract in copper toxicosis in Labrador retrievers: A new canine model for copper-metabolism disorders // *Dis. Model. Mech.* 2016. V. 9. № 1. P. 25–38.
<https://doi.org/10.1242/DMM.020263>
 54. Miyayama T., Suzuki K.T., Ogra Y. Copper accumulation and compartmentalization in mouse fibroblast lacking metallothionein and copper chaperone, Atox1 // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2009. V. 237. № 2. P. 205–213.
<https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2009.03.024>
 55. Jomova K., Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease // *Toxicology.* 2011. V. 283. № 2–3. P. 65–87.
<https://doi.org/10.1016/J.TOX.2011.03.001>
 56. Zhang J.W., Liu J.X., Hou H.M. et al. Effects of tetrathiomolybdate and penicillamine on brain hydroxyl radical and free copper levels: a microdialysis study *in vivo* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015. V. 458. № 1. P. 82–85.
<https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2015.01.071>
 57. Alvarez H.M., Xue Y., Robinson C.D. et al. Tetrathiomolybdate inhibits copper trafficking proteins through metal cluster formation // *Science.* 2010. V. 327. № 5963. P. 331–334.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1179907>
 58. Scheinberg I.H., Walshe J.M. *Orphan Diseases and Orphan Drugs.* Manchester: Univ. Press, 1986. V. 3. 228 p.
 59. Walshe J.M. The conquest of Wilson's disease // *Brain.* 2009. V. 132. Pt 8. P. 2289–2295.
<https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWP149>
 60. Brewer G.J. Zinc and tetrathiomolybdate for the treatment of Wilson's disease and the potential efficacy of anticopper therapy in a wide variety of diseases // *Metallomics.* 2009. V. 1. № 3. P. 199–206.
<https://doi.org/10.1039/B901614G>
 61. Weiss K.H., Askari F.K., Czlonkowska A. et al. Bis-choline tetrathiomolybdate in patients with Wilson's disease: An open-label, multicentre, phase 2 study // *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2017. V. 2. № 12. P. 869–876.
[https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(17\)30293-5](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(17)30293-5)
 62. Stremmel W. Bis-choline tetrathiomolybdate as old drug in a new design for Wilson's disease: Good for brain and liver? // *Hepatology.* 2019. V. 69. № 2. P. 901–903.
<https://doi.org/10.1002/HEP.30130>
 63. Goodman V., Brewer G., Merajver S. Control of copper status for cancer therapy // *Curr. Cancer Drug Targets.* 2005. V. 5. № 7. P. 543–549.
<https://doi.org/10.2174/156800905774574066>
 64. Tetrathiomolybdate, a copper chelator for the treatment of Wilson disease, pulmonary fibrosis and other indications – PubMed (Электронный ресурс). URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18683094/> (accessed: 01.04.2022).
 65. Ishida S., McCormick F., Smith-McCune K. et al. Enhancing tumor-specific uptake of the anticancer drug cisplatin with a copper chelator // *Cancer Cell.* 2010. V. 17. № 6. P. 574–583.
<https://doi.org/10.1016/J.CCR.2010.04.011>
 66. Blockhuys S., Celauro E., Hildesjö C. et al. Defining the human copper proteome and analysis of its expression variation in cancers // *Metallomics.* 2017. V. 9. № 2. P. 112–123.
<https://doi.org/10.1039/C6MT00202A>
 67. Urso E., Maffia M. Behind the link between copper and angiogenesis: Established mechanisms and an overview on the role of vascular copper transport systems // *J. Vasc. Res.* 2015. V. 52. № 3. P. 172–196.
<https://doi.org/10.1159/000438485>
 68. Maryon E.B., Molloy S.A., Kaplan J.H. Cellular glutathione plays a key role in copper uptake mediated by human copper transporter 1 // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2013. V. 304. № 8.
<https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00417.2012>
 69. Puig-Pijuan T., Souza L.R.Q., Da C. et al. Copper imbalance linked to oxidative stress and cell death during Zika virus infection in human astrocytes // *bioRxiv.* 2021. P. 2021.12.29.474370.
<https://doi.org/10.1101/2021.12.29.474370>

The *ATOX1* Gene Role in Copper Metabolism and in the Copper-Induced Diseases Pathogenesis

I. Zh. Zhalsanova^{a, *}, E. A. Fonova^a, D. I. Zhigalina^a, and N. A. Skryabin^a

^a*Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, 634050 Russia*

^{*}*e-mail: irina.zhalsanova@medgenetics.ru*

The *ATOX1* (Antioxidant Protein 1) is a human copper metal chaperone that plays an important role in cellular copper homeostasis. The protein is responsible for cytosolic copper absorption from CTR1 (copper transporter 1) and transport to the copper pumps in the Trans Golgi network to the ATP7A and ATP7B proteins. This review collected data on the antioxidant role of *ATOX1*, the gene role in the angiogenesis regulation and cancer cell proliferation, and the role in the copper-induced diseases pathogenesis – Wilson's disease and Menkes disease.

Keywords: *ATOX1*, metallochaperones, Wilson's disease, Menkes disease.

ОБЗОРНЫЕ И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 619:636.2:575:001.608.1

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К КЕТОЗУ У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ

© 2023 г. О. В. Соколова¹ *, М. В. Бытов¹, А. И. Белоусов¹, Н. А. Безбородова¹,
В. Д. Зубарева¹, Н. А. Мартынов¹, О. С. Зайцева¹, И. А. Шкуратова¹

¹Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр
Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, 620142 Россия

*e-mail: nauka_sokolova@mail.ru

Поступила в редакцию 27.04.2022 г.

После доработки 27.06.2022 г.

Принята к публикации 12.07.2022 г.

Высокая молочная продуктивность коров связана с интенсивным функционированием всех органов и систем, что предрасполагает к развитию различных форм нарушений обменных процессов. Формирование энергетического дисбаланса у высокопродуктивных коров в лактирующий период способствует развитию комплексных метаболических нарушений, отрицательно влияющих на продуктивное здоровье и репродуктивный потенциал. Интерес к разведению крупного рогатого скота, более устойчивого к кетозу, является глобальным, а поиск мутаций, аллельных вариантов генов и изучение молекулярно-генетических процессов, формирующих тот или иной фенотип, являются ключевыми этапами в понимании этиологии, степени предрасположенности к заболеванию и разработке успешных селекционных программ. В настоящем обзоре представлены результаты исследований, направленных на поиск генетических маркеров развития кетоза крупного рогатого скота на основе молекулярно-генетических методов. В обзоре представлены локализация SNPs по данным метаанализа GWAS, протеин–протеин взаимодействия ассоциированных с ними генов-кандидатов при помощи STRING, а также аннотация SNPs по ключевым биологическим процессам с их участием. Приведен профиль экспрессии генов-кандидатов для ассоциированных с кетозом тканей на основе известных данных по человеку с применением GTEx.

Ключевые слова: кетоз, крупный рогатый скот, генетические исследования, ПГАА, утерянная наследуемость, бета-гидроксимасляная кислота.

DOI: 10.31857/S0016675823030116, **EDN:** IQMSXQ

Современная селекция крупного рогатого скота, направленная исключительно на повышение производства молока без внимания к другим чертам фенотипа, приводит к увеличению частоты развития различных патологий: мастита, заболеваний конечностей, дисфункций яичников и других болезней репродуктивной системы [1, 2], а также снижению генетического разнообразия и адаптивности животных [3]. В структуре заболеваний незаразной этиологии у высокопродуктивных коров особое место занимают метаболические нарушения, характеризующиеся повышенным образованием и резким увеличением содержания кетоновых тел в крови, молоке и моче животных. Развитие первичного кетоза, вызванного энергетическим дисбалансом, сопровождается возникновением целого ряда физиологических реакций, наиболее важными из которых можно считать синдром трофической недостаточности, интоксикационный синдром и местную воспалительную реакцию [4]. Использование новейших до-

стижений в области клинической ветеринарной биохимии позволяет расширить диагностические возможности, повысить своевременность и эффективность лечебно-профилактических мероприятий [5].

Несмотря на успехи клинической биохимии, поиск генетических маркеров, ассоциированных с кетозом [6], остается актуальной проблемой современной ветеринарии. Стоит отметить, что даже в одних и тех же условиях содержания и при схожем уровне молочной продуктивности диапазон адаптационных возможностей у коров различается. Это дает основание предполагать, что адаптационный процесс во многом зависит от генетических особенностей организма животного [7, 8]. Необходимо учесть, что метаболические заболевания по своей природе многофакторны, невозможно выделить конкретный ген или полиморфизм, который бы являлся ответственным за развитие данных заболеваний [9, 10]. Основные направления в изучении генетической этиологии кетоза включают

в себя полногеномный анализ ассоциаций (ПГАА, GWAS) [11, 12], исследование экспрессии генов с помощью как RNA-seq [13, 14], так и real-time qRT-PCR [15], кДНК-чипов [16], а также анализ ассоциаций генов-кандидатов [10].

Полногеномный анализ ассоциаций в медицине уже имеет свою весьма успешную историю [17–19]. При исследовании кетоза у коров с помощью ПГАА индикатором субклинической и клинической стадий болезни служит высокая концентрация β -гидроксимасляной кислоты как в молоке, так и в крови [12] или фенотипом для ПГАА может служить диагноз животного в целом. Так, S. Nayeri с соавт. [12] был проведен полногеномный анализ ассоциаций, в результате которого были обнаружены ранее неидентифицированные гены, связанные с субклиническим кетозом как во время первой лактации, так и для последующих. В целом авторы указывают о статистически значимых SNPs (single nucleotide polymorphisms) в генах, имеющих тесную взаимосвязь с ключевыми регуляторами иммунной системы: TNF (для субклинического кетоза в первую и последующие лактации), IFNG (для субклинического кетоза в первую лактацию), LEP (для субклинического кетоза во вторую и последующие лактации). Большая часть обнаруженных в данном исследовании транскриптов кандидатных генов играет роль в процессах иммунной системы животных, также часть генов кодирует транспортеры различных ионов. Например, IL-8 (ген *CXCL8*) — это один из главных медиаторов воспалительной реакции, секретируемый, главным образом нейтрофилами, действующими в месте инфекционного воспаления. Исследователи указывают на предыдущее исследование связи кетоновых тел и врожденного иммунного ответа эпителиальных клеток молочной железы (усиленная экспрессия IL-8) на инфицирование *Escherichia coli* [20]. В целом результаты S. Nayeri и соавт. [12] не противоречат результатам предыдущих исследований, в которых отмечается взаимосвязь метаболических заболеваний и иммунной системы [21].

В цели ПГАА не входит биологическая интерпретация: каким именно образом конкретные мутации влияют на молекулярные процессы в клетках — изменяется ли уровень экспрессии гена-кандидата, влияет ли мутация на эффективность работы транслируемого белка и т.д. Также не ясна общая картина взаимодействия генов при кетозе: в какой момент заболевание приводит к тому, что мутации в таких генах как *CXCL-8* и TNF начинают играть ключевую роль в его развитии, и в каких именно тканях и клетках генетические нарушения являются значимыми при воспалении [22]. Поскольку имеются исследования о том, что ряд генов и метаболических путей вносит значительный вклад в развитие кетоза в разные временные промежутки, следует проводить функциональные ис-

следования на основе результатов ПГАА на животных в течение всего транзитного периода [23]. Одним из первых и доступных вариантов анализа результатов ПГАА может стать аннотация локализации обнаруженных SNP относительно близлежащих генов или генов, непосредственно в которых данные SNP и были обнаружены.

R.A.N. Soares и соавт. был проведен метаанализ данных, приведенных в статьях по экспрессии генов при кетозе, а также метаанализ исследований ПГАА, в которых был определен список генов-кандидатов и ряд SNP, имеющих высокую статистическую значимость в формировании синдрома [24]. Локализация SNPs относительно генов/ближайших генов представлена на рис. 1. Аннотация проведена при помощи https://www.ensembl.org/Bos_taurus/Tools/VEP сборка ARS-UCD1.2 [25].

Мутации в межгенных участках не приводят к заменам аминокислот в белке, однако возможно имеют значение в формировании ДНК-протеин-комплекса (например, места связывания с гистонами или транскрипционными факторами) [26], могут иметь как нисходящий или восходящий эффект на прилежащий ген (например, воздействие на открытые рамки считывания) [27], так и иметь эффект на пространственно близкие, но дистальные по нуклеотидной последовательности гены. Также мутации в межгенных участках могут оказывать воздействие на регуляторные механизмы (например, энхансеры и сайленсеры) [28], связанные с активацией экспрессии дискретных наборов генов на расстоянии нескольких тысяч нуклеотидов. Изменения в связывании протеина с энхансером перепрограммируют экспрессию генов и влияют на фенотип клетки [29, 30]. Также межгенные регионы могут включать в себя еще не обнаруженные гены, такие как регуляторные некодирующие РНК. Несмотря на то что информации о них не так много, известно, что они выполняют регуляторные функции. Уже почти два десятилетия проект ENCODE проводит подробные исследования межгенных регионов у человека [31].

Обнаруживаемые в результате ПГАА SNP в интронах могут стать отправной точкой в изучении зависимости между полиморфизмом в интронах и уровнем экспрессии гена-кандидата, поскольку известно, что полиморфизм в сайтах узнавания сплайсосом пре-мРНК влияет на процесс сплайсинга и следовательно на уровень экспрессии конечного транскрипта гена [27, 32, 33].

Мутации в кодирующих частях могут происходить в кодонах, соответствующая аминокислота которых у мутантного типа ослабляет функциональную активность кодируемого транскрипта или приводит к синонимичным заменам (миссенс, сеймсенс мутации) [34, 35], транскрибирует его (нонсенс-мутации) [36]. Биологическая интерпретация возможных эффектов полиморфизма

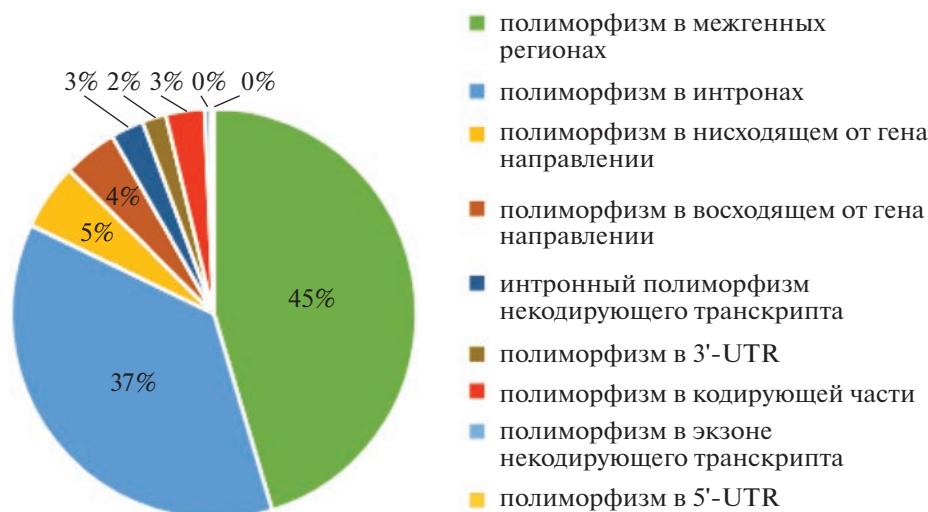


Рис. 1. Аннотация SNP относительно локализации в геноме.

является ключевым этапом в понимании молекулярно-генетической этиологии кетоза по результатам GWAS [37].

Про UTRs (нетранслируемые регионы) известно, что они имеют ключевые функции в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов, включая направление транспорта мРНК из ядра, эффективность трансляции [38], внутриклеточную локализацию [39] и стабильность [40]. Исследования по влиянию полиморфизмов в UTR-участках проведены для некоторых генов [41, 42], однако анализ комплекса генов-кандидатов, ассоциированных с кетозом, при помощи такого подхода еще не проведен.

Значимые функции, выполняемые некодирующими транскриптами, экспрессируемыми от гибридных генов (генов, экспрессирующих как мРНК, так и некодирующие транскрипты), включают регуляцию сплайсинга мРНК и мРНК процессинга, активность “микроРНК-губок”, конкурентную ассоциацию/диссоциацию белка, связывающего РНК, экспрессию микропептидов/микропротеинов [43].

Биологическая интерпретация результатов GWAS представляется проще, когда статистически значимые SNP находятся вблизи друг от друга и в кодирующей последовательности. Например, в ходе работы S. Nayeri и соавт. при анализе ассоциаций с субклиническим кетозом во время первой лактации были выявлены четыре SNP в первом интроне гена *GC* [12]. Ген *GC* кодирует витамин D, связывающий протеин, который является основным переносчиком витамина D3. И у людей, и у крупного рогатого скота во время инфекции моноциты и макрофаги экспрессируют фермент, который конвертирует витамин D в его активную форму (25(OH)D3), играющую важную

роль в функционировании иммунной системы [44]. Локализация SNP в интронах, в том числе первом, вероятно не имеет значения в функциональной активности или конформации белка, однако может играть ключевую роль в уровне экспрессии гена [45, 46]. Представленные в настоящей работе и обнаруживаемые в дальнейшем гены, ассоциированные с функциями иммунной системы, согласуются с ролью местной воспалительной реакции при кетозе, как упомянуто выше. Таким образом, подробное изучение уровня экспрессии гена *GC* в зависимости от метаболического статуса крупного рогатого скота может стать одним из шагов в понимании изменений в иммунном статусе при кетозе.

Схожим примером могут служить результаты работы V. Kroezen и соавт. [10] по поиску генов-кандидатов для кетоза во время первой лактации. Получены статистически значимые SNPs для гена *CPT1A* (карнитинпальмитойлтрансфераза формы 1A), локализующиеся в 3'-UTR гена. Митохондриальное окисление длинноцепочечных жирных кислот инициируется последовательными реакциями карнитинпальмитойлтрансферазы I (локализованной на внешней мембране митохондрии) и карнитинпальмитойлтрансферазы II (локализованной на внутренней мембране) вместе с карнитинацилкарнитинтранслоказой. *CPT1A* является ключевым ферментом в карнитин-зависимом транспорте по внутренней мембране митохондрии и его дефицит приводит к снижению β -окисления жирных кислот [47]. При увеличении экспрессии *CPT1A* окисление жирных кислот может быть усилено и в некоторой степени может способствовать инсулинрезистентности. Накопление жирных кислот в клетках может привести к формированию инсулинрезистентности, способной сформировать развитие диабета 2-го типа и ги-

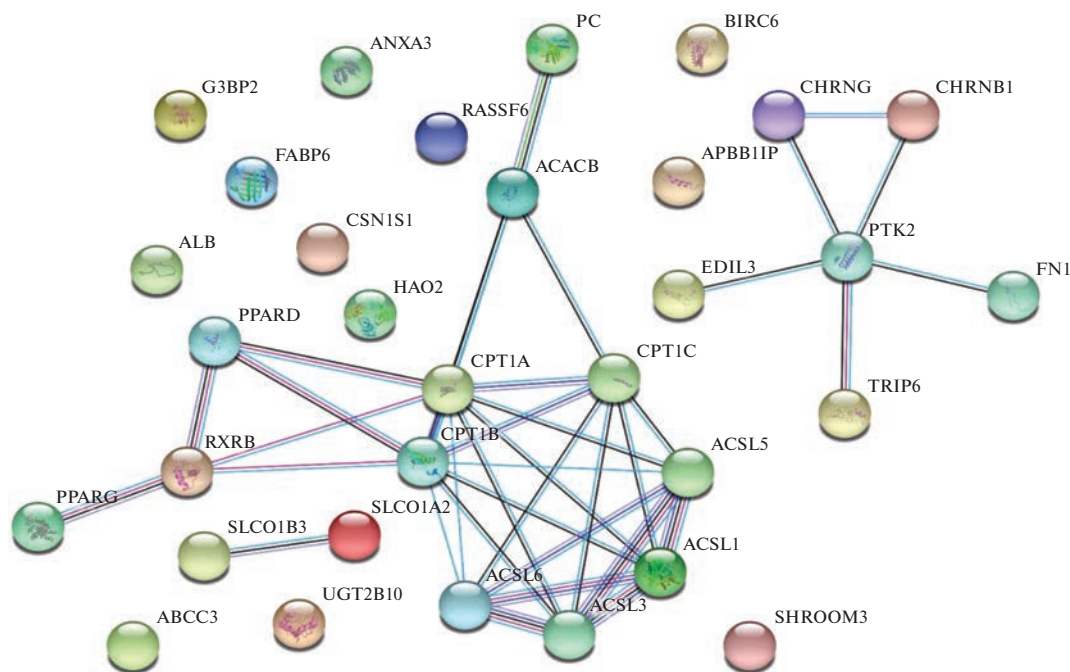


Рис. 2. Протеин–протеин взаимодействия, определенные при помощи веб-приложения STRING для генов, обозначенных в метаанализе ПГАА.

перинсулинемии [48]. 3'-UTRs сигнальных РНК хорошо изучены с точки зрения регуляции процессов мРНК, таких как локализация мРНК, их стабильность и трансляция. Дополнительно 3'-UTRs опосредуют протеин–протеин взаимодействия, таким образом передавая генетическую информацию, закодированную в 3'-UTRs до протеинов. Показано, что данная функция регулирует разнообразные свойства протеинов, включая сложные конформации белков и посттрансляционные модификации. Таким образом, 3'-UTR опосредованный информационный трансфер может регулировать свойства белков, которые не закодированы в аминокислотной последовательности [49–51].

Полученные исследователями результаты показывают большие надежды, однако стоит учитывать ограничения, которые накладывает низкая наследуемость такого изучаемого явления как кетоз (о наследуемости комплексных фенотипов далее). Сами исследователи указывают на то, что требуются дальнейшие валидационные исследования для полученных ими результатов, в том числе и для того, чтобы определить эффекты потенциальных редких аллелей, которые вероятно не были ими обнаружены. Идентификация и понимание генетических маркеров предрасположенности к кетозу пойдут на пользу всей молочной индустрии, предоставляя хозяйствам, племенным организациям и ветеринарным специалистам инструмент для прогнозирования степени предрасположенности коров к данному заболеванию [10].

Пересекающиеся в GWAS-исследованиях гены-кандидаты, представленные в уже упомянутом метаанализе [24], имеют некоторые протеин–протеин взаимодействия, определенные нами на рис. 2 при помощи веб-приложения STRING с настройкой без “майнинга текста” [52] (SLCO1B1, SLCO10A1 не найдены в базе STRING для *Bos taurus*).

На рис. 2 представлены три группы связанных генов. Дальнейшее описание проведено на основе статей о генетике человека. *CHRNA1* и *CHRNA2* являются генами, кодирующими субъединицы гамма-рецептора ацетилхолина. Рецептор ацетилхолина меняет конформацию при связывании с ацетилхолином, приводя к открытию ионного канала на поверхности плазмалеммы. Мутации в гене рецептора ассоциируются с замедленной работой канала, врожденным миастеническим синдромом [53]. Предполагаемые гомологи *CHRNA1* и *CHRNA2* имеют корреляционные отношения по уровню экспрессии с *PTK2*-геном, однако такие отношения установлены только для других организмов. Протеин PTK2 (protein tyrosine kinase 2, протеинкиназа тирозина 2) кодируется геном *PTK2*. PTK2 является ключевым адгезин-ассоциированным белком, участвующим в клеточном сцеплении (как клетки адгезируются друг к другу и окружению) и передвижении (как клетки передвигаются) [54]. Схожие взаимоотношения PTK2 установлены для других организмов с *EDIL3* и *FN1*. Egf-подобные повторы и дискоидиновые домены протеин 3 кодируются геном *EDIL3* и являются интегриновым лигандом Del-1-рецеп-

тора, играющего ключевую роль в опосредовании ангиогенеза и возможно участвующего в перестройке и развитии стенок сосудов. Он также оказывает влияние на поведение эндотелиальных клеток [55]. FN1 (фибронектин 1) связывает клеточные поверхности и различные компоненты, включая коллаген, фибрин, гепарин, ДНК и актин. Фибронектины вовлечены в клеточную адгезию, способность клеток к передвижению, опсонизацию, ранозаживление и поддержание формы клетки [56]. О схожем отношении с PTK2, обнаруженном у других организмов, также можно сказать про TRIP6, который расположен на ключевых сайтах адгезии и вдоль стрессовых волокон актина. Накопление данного протеина у плазмалеммы происходит в ЛФК-зависимой манере (лизофосфатидная кислота) и регулирует ЛФК-индуцируемую миграцию клеток. Известны альтернативно сплайсированные варианты, кодирующие разные изоформы TRIP6, однако некоторые из них не до конца описаны [57].

В следующей группе в середине рис. 2 представлено три тесно связанных гена *CPT1A*, *CPT1B*, *CPT1C* (все три изоформы *CPT1*) [58], являющихся изоформами карнитин-О-пальмитоилтрансферазы: печеночной, мышечной и мозговой соответственно, и их связь в результате анализа очевидна [47]. Были обнаружены альтернативно сплайсированные транскрипты, кодирующие разные изоформы гена [59]. Каждый из них связан и имеет корреляционные отношения по уровню экспрессии с геном *ACACB*, однако такие отношения установлены только для других организмов. Acetyl-CoA carboxylase (ацетил-КоА карбоксилазы) представляют собой систему мультифункциональных ферментов. *ACC* является геном, кодирующим биотин-содержащий фермент, который катализирует карбоксилирование ацетил-КоА до малонил-КоА (лимитирующая реакция в синтезе жирных кислот). *ACC-β* (или *ACC2*) предположительно контролирует оксидацию жирных кислот посредством способности малонил-КоА ингибировать работу карнитинпальмитоилтрансферазы I, участвующей в лимитирующей реакции потребления жирных кислот и их оксидации в митохондриях. *ACC2* может быть скорее всего вовлечен в регуляцию окисления жирных кислот [60]. В свою очередь, *ACACB* имеет связь с *PC* (у других организмов обнаружены коэкспрессионные отношения, соседство по расположению в геноме). Пируваткарбоксилаза (*PC*) [61] катализирует карбоксилирование пирувата до аксалоацетата. *PC* участвует в глюконеогенезе, липогенезе, секреции инсулина и синтезе нейротрансмиттера глутамата [62]. С тесной связью на рис. 2 также представлены *ACSL1*, *ACSL3*, *ACSL5*, *ACSL6* (long-chain acyl-CoA synthetase), которые кодируют представителей семейства лигаз длинноцепочечных жирных кислот коэнзима А. И хотя они обла-

дают субстратной специфичностью, внутриклеточной локализацией, распределением по тканям, все изозимы этого семейства конвертируют свободные длинные жирные кислоты до эфиров ацил-КоА и таким образом играют ключевую роль в биосинтезе липидов и деградации жирных кислот [63]. Интересно, что 1, 3, 5, 6 изоформы ацил-КоА-синтетазы жирных кислот с длинной цепью имеют взаимосвязь с изоформами карнитин-О-пальмитоилтрансферазы, существует предположительная модель комплекса этих протеинов на внешней мембране митохондрий [64]. В анализе STRING была обнаружена пара генов, имеющих разные функции: ген рецептора, активируемого пероксисомным пролифератором (*PPARG*, *PPARD*) и ретиноидный X-рецептор (*RXR*). Однако проведены исследования, в которых показано, что они вовлечены в развитие рака эндометрия, ассоциированного как с ожирением, так и с резистентностью к инсулину [65].

Третья получившаяся в результате анализа группа — пара *SLCO1A2* и *SLCO1B3* — члены семейств 1B2 и 1A2, являющихся переносчиками растворенных носителей органических анионов в печени, а также влияющих на поглощение стероидов [66]. Стоит отметить, что данные представители семейства переносчиков растворенных носителей органических анионов играют ключевую роль в метаболизме лекарственных препаратов [67].

Общая картина взаимодействия почти всех представленных в настоящей работе генов описана в другой работе автора метаанализа [68]. Необходимо подчеркнуть, что данных по взаимодействию (в том числе коэкспрессионных отношений) генов по результатам исследований человека намного больше, чем схожих исследований по протеин—протеин и ген—ген взаимодействиям у *Bos taurus*. Получение таких знаний представляется крайне актуальным для понимания природы сложных заболеваний крупного рогатого скота, в том числе метаболических.

В целом процессы, ассоциированные с генами по результатам метаанализа [24], можно аннотировать при помощи Generic Gene Ontology Term Finder [69] для биологических процессов. Полученные результаты визуализированы при помощи REVIGO (рис. 3) [70].

Аннотация генов по биологическим процессам не противоречит общим представлениям о кетозе, характеризующемся гиперкетонемией [71]. Кетонные тела (β -гидроксимасляная кислота ацетоацетат, ацетон) — группа органических соединений, являющихся промежуточными метаболитами жиров, представляющих собой альтернативный продукт окисления свободных жирных кислот в печени [72]. Кетоз ассоциирован с тяжелым отрицательным энергетическим балансом: поступление неэффективных источников энергии, не удовле-

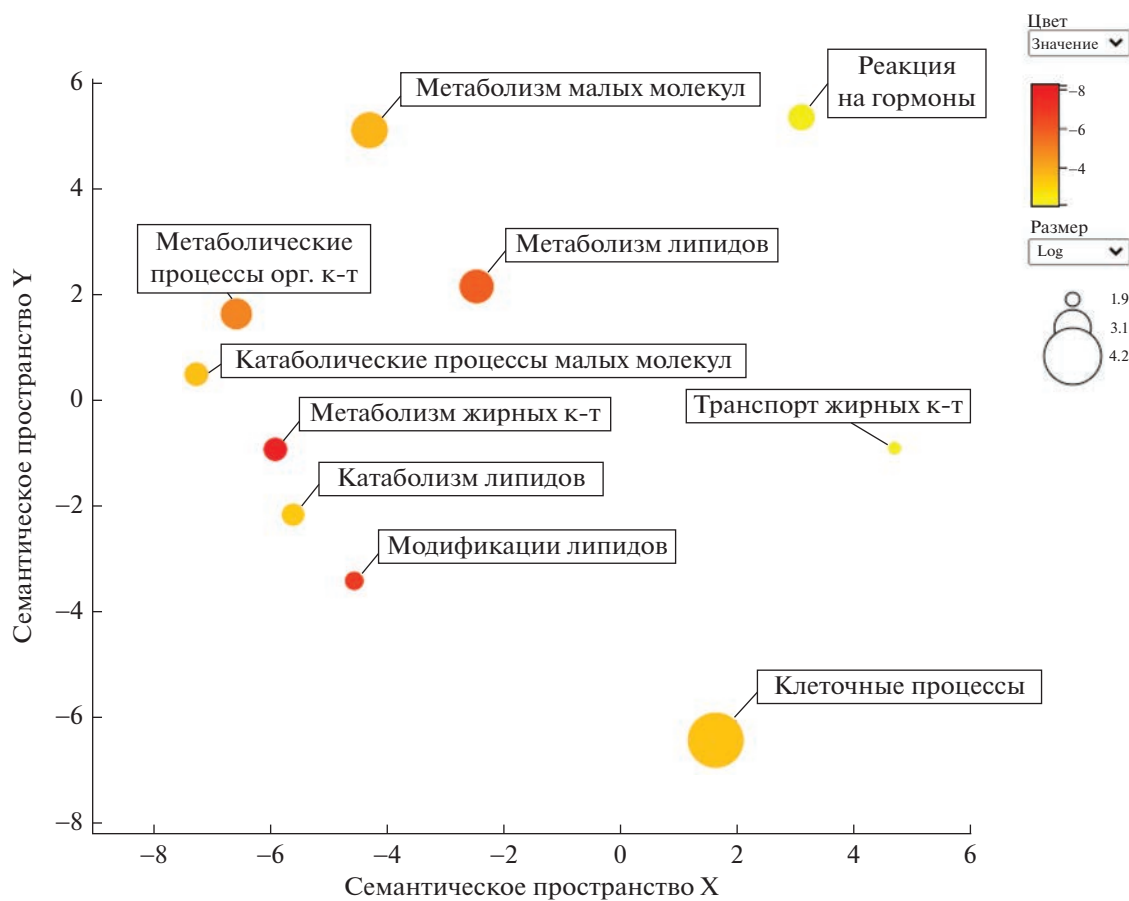


Рис. 3. Группы биологических процессов, ассоциированных с кетозом по данным метаанализа ПГАА.

творяющих высоким требованиям организма для производства молока в раннем лактационном периоде, дефицит в рационе легкоусвояемых сахаров [6]. Отрицательный энергетический баланс является триггером процесса окисдации жира, запасаемого в адипозных тканях, и приводит к тому, что большие количества свободных жирных кислот в крови окисляются до кетоновых тел. Липопротеины низкой плотности связываются со своими рецепторами в целевых клетках, эфиры холестерина гидролизуются лизосомами до свободного холестерина и жирных кислот. Ацетил-КоА после реакции окисления жирных кислот становится источником энергии в цикле Кребса. Когда цикл Кребса заторможен, чрезмерное количество ацетил-КоА может приводить к образованию кетоновых тел [73, 74]. Таким образом, свободные жирные кислоты преобразуются печеню в кетоновые тела и используются в качестве альтернативного источника энергии для многих тканей организма. Тем самым достигается главный биологический смысл — восстановление энергетического баланса [75].

Печень как один из главных органов, в котором протекают ключевые биохимические реакции, в том числе метаболизм углеводов и липидов [76, 77], представляет наибольший интерес с точки зрения экспрессии ключевых для патогенеза кетоза генов [16, 78]. Однако исследование крови методологически более удобно и представляется возможным вариантом изучения зависимости экспрессионной активности генов от физиологического состояния животного [13, 14]. Данные по экспрессии рассматриваемых нами генов в человеческих тканях представлены на рис. 4 (для SLCO10A1 данных нет) при помощи веб-сервиса GTEx [79]. Уровень экспрессии генов может быть промежуточным показателем между генотипом и сложным признаком и является модификатором предрасположенности к заболеваниям [80–82].

Не менее важным аспектом в изучении кетоза является оценка уровня экспрессии генов в зависимости от стадий отрицательного энергетического баланса, которые проходит животное. Имеются данные о сравнении уровня экспрессии генов клеток печени при помощи микрочипов у животных

с индуцированным кетозом [16], у животных с разной диетой [83]. Проведены исследования индуцированного кетоза в сравнении с контролем при помощи RNA-Seq [84], а также сравнение экспрессии генов жировой ткани между коровами с кетозом и здоровыми животными при помощи количественной real-time RT-PCR [15]. Все перечисленные исследования основаны на единомomentном сравнении групп между собой. Однако исследования, направленные на определение динамики изменений экспрессионного профиля в зависимости от физиологического состояния животного (например, в транзитный период) [85], могут представлять особый интерес для определения ключевых значений уровня экспрессии генов-кандидатов, формируя более ясную картину их коэкспрессионных отношений.

Низкая концентрация инсулина на фоне инсулинорезистентности способствует независимому поглощению питательных веществ молочной железой, тогда как инсулинзависимые ткани увеличивают окисление жирных кислот и уменьшают использование глюкозы [86]. С учетом этого дальнейшие исследования в области экспрессионной активности тканей и органов, в частности эндокринных, могут представлять особый интерес.

Ключевым аспектом в изучении гиперкетонемии является наследуемость данного фенотипа. Проведен ряд исследований наследуемости метаболических заболеваний у коров молочных пород, в том числе для кетоза, однако ее степень оценивается низкой [1, 72, 87, 88]. Стоит отметить, что коэффициенты наследуемости, полученные при линейном регрессионном анализе бинарных данных ("0" – животное не болеет, "1" – животное болеет), зависят от частоты встречаемости болезни в исследовательской выборке, в связи с чем результаты отдельных исследований не могут сравниваться между собой [88]. В других исследованиях о наследуемости уровня β -гидроксимасляной кислоты в молоке коров, основанных на имеющихся в хозяйствах данных, она оценивается как низкая и варьирует от 0.02 до 0.14 [89].

В целом характерная для кетоза низкая наследуемость может быть связана с проблемой утерянной наследуемости, характерной для явлений сложной природы. Патогенез мультифакторных заболеваний часто зависит от промежуточных фенотипов с количественным наследованием. А. Blanco-Gómez и соавт. утверждали, что недетектированные промежуточные фенотипы могут объяснить большую часть утерянной наследуемости [90], соответственно использование непрерывных величин для описания подтипов кетоза как фенотипа (например, ИК-Фурье спектроскопия

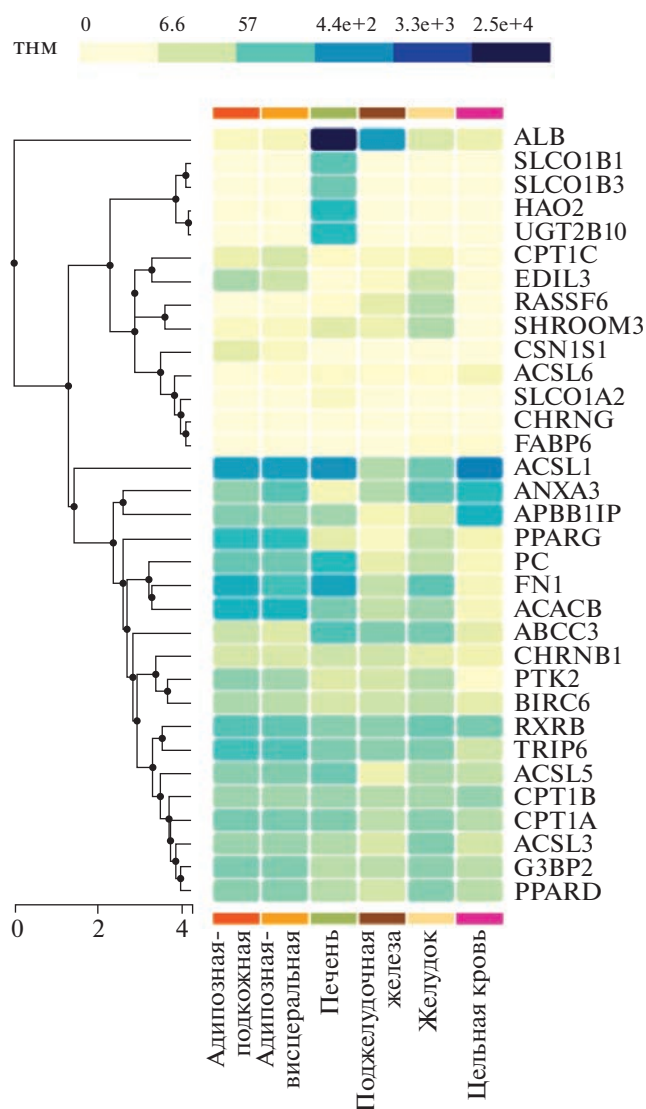


Рис. 4. Данные об уровне экспрессии в тканях человека генов-кандидатов, обозначенных в метаанализе ПГАА. тмм – транскриптов на миллион.

крови для определения концентрации β -гидроксимасляной кислоты) позволит определять субклинические случаи болезни, более высокие частоты распространения и более высокие значения наследуемости фенотипа [91].

Несмотря на то что было выдвинуто много гипотез для решения проблемы утерянной наследуемости явлений, реальные причины этой проблемы остаются неизвестными. Многие характеристики, такие как размер тела, имеют высокую степень наследуемости. Уже доказано, что 80–90% изменчивости размера тела объясняются наследственностью. Несмотря на то что уже идентифицировано много аллелей, ассоциированных с данным фенотипом, они объясняют только около

5–10% изменчивости фенотипа. Это один из случаев сложных, комплексных фенотипов, и в целом существует большой разрыв между тем, какую долю изменчивости сложного фенотипа ожидается объяснить генетическими изменениями (“ожидаемая наследуемость”), и тем, какую степень наследуемости действительно получилось связать с аллельными вариантами. Эта разница и получила название “утерянная наследуемость” [90].

Вопрос о том, почему не у всех коров с высокими показателями молочной продуктивности наблюдается клиническая картина кетоза, все еще остается открытым, несмотря на значительный технический прогресс в транскриптомике, протеомике и геномике [10]. Наследуемость комплексных фенотипов также зависит от вклада факторов окружающей среды [92]. Таким образом, чем больше фенотипической изменчивости объясняется внешними факторами, тем меньше фенотипической изменчивости объясняется генетическими предикторами, и *vice versa*. Следовательно, точность фенотипической изменчивости может значительно варьировать от популяции к популяции, находящихся под воздействием разных факторов окружающей среды. Примером могут служить внешние факторы, способствующие развитию кетоза, например качество и полноценность корма, а также нормирование рациона в зависимости от физиологического состояния [74].

Существует предположение о том, что проблема утерянной наследуемости может быть решена через генетические взаимодействия или, по-другому, эпистазис. Утерянная наследуемость в узком понимании базируется на представлении, что не существует взаимодействий между аллелями и что их эффекты имеют только аддитивную природу. Но такое понимание проблемы не совсем верно, поскольку эпистатические взаимодействия также оказывают влияние на наследуемость в широком смысле этого слова. Таким образом, существует предположение, что значительная часть утерянной наследуемости может объясняться не аллельными вариантами, которые еще предстоит открыть, а эпистатическими взаимодействиями между аллелями, которые уже открыты. Хотя может быть и так, что предположительно все аллельные формы, ответственные за изменчивость фенотипа, уже изучены, однако их аддитивный эффект не объясняет всей изменчивости комплексного фенотипа. Поэтому объясненная наследуемость всегда будет меньше всей наследуемости [93]. В любом случае исследование эпистатических явлений в генетике является очень трудной задачей, требующей большой выборки. Степень вклада генетических взаимодействий в явление утерянной наследуемости

еще предстоит исследовать, как, например, еще предстоит исследовать предположение о том, что эпигенетические изменения имеют эффект на экспрессию генов от индивидуума к индивидууму, что, в свою очередь, оказывает влияние на изменчивость фенотипа. Как бы то ни было, все эти попытки объяснить причины проблемы утерянной изменчивости еще предстоит проверить экспериментальными исследованиями [94], и такой “пробел в знаниях” отмечается не только в ветеринарии, но и в разных областях медицины [95–97].

Если кетоз — многофакторное заболевание по своей этиологии, то можно сказать, что поиск генов-кандидатов, ассоциированных с повышенным уровнем бета-гидроксимасляной кислоты, является задачей только для одного из промежуточных фенотипов. Целесообразен поиск, например, генов, ассоциированных с резистентностью к инсулину, генов, мутации в которых нарушают стабильность окисления жирных кислот (а также поиск аллельных вариантов, ассоциированных с высокой скоростью окисления). Тогда будут обнаружены промежуточные фенотипы, имеющие значительный вклад в такой сложный признак как предрасположенность к кетозу.

В последние годы разрабатываются новые статистические модели для определения ассоциации между генетическим локусом или аллелем и несколькими признаками, чтобы идентифицировать плейотропию [98], а также вклад промежуточных фенотипов [99]. Исследователями в этой области отмечается интересное явление: некоторые плейотропные локусы не имеют общих SNP, но вместо этого различные SNP являются казуальными для разных признаков. Эти плейотропные локусы ассоциированы с несколькими признаками, однако они не имеют общих генетических аллелей для разных ассоциаций. Существует две модели плейотропии в таких случаях [100]. Первая называется моделью горизонтальной плейотропии, когда генетические аллели имеют прямой эффект на два или более признака. Вторая модель — модель вертикальной плейотропии, когда аллель имеет прямой эффект на какой-либо признак и эффект на второй признак опосредованно через первый [101]. Таким образом проводятся исследования с целью обнаружить ассоциации комплексного признака с некоторыми аллельными вариантами предположительно ключевых генов в патогенезе кетоза: гены лептина и его рецептора [9, 102, 103], ген 5'АМФ-активируемой протеинкиназы [104], гены аполипопротеинов и их рецепторов [105, 106] и других. Однако исследовать аллельные варианты не менее значимых в воз-

можной этиологии кетоза генов, таких как ген грелина, еще предстоит.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на длительную историю исследования кетоза с биохимической точки зрения, задача детерминировать генетические факторы, ассоциированные с развитием данного метаболического синдрома у коров, остается актуальной. Количество исследований генетической предрасположенности к кетозу с применением ПГАА недостаточно для однозначных выводов и требуется их дальнейшая валидация на разных выборках. Результаты уже проведенных исследований нуждаются в экспериментальной проработке как с точки зрения связи аллельный вариант—фенотип, так и с точки зрения молекулярных взаимодействий в клетке (например, экспрессионная активность генов в зависимости от аллельного варианта — функциональное аннотирование). Для высокого разрешения получаемых в ПГАА результатов возможно применение комбинации метода с ПЦР-ПДРФ и/или секвенирования отдельных генов, в которых, например, обнаружены SNPs с высокой статистической значимостью. Также необходимы исследования эпигенетических особенностей и эпистатических взаимодействий для экспериментального изучения молекулярно-генетических процессов, ассоциированных с кетозом. Такой комплексный подход позволит лучше понять патогенез заболевания и идентифицировать аллели, которые вносят вклад в предрасположенность к развитию заболевания.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Минобрнауки России по теме № 0532-2022-0004 “Разработка технологии для маркер-ориентированной селекции крупного рогатого скота по генам, ассоциированным с устойчивостью к заболеваниям”.

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. *Berry D.P., Bermingham M.L., Good M., More S.J.* Genetics of animal health and disease in cattle // *Irish Veterinary J.* 2011. V. 64. № 5. P. 1–10. <https://doi.org/10.1186/2046-0481-64-5>

2. *Zinovieva N.A.* Haplotypes affecting fertility in holstein cattle // *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya.* 2016. V. 51. P. 423–435. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2016.4.423eng>
3. *Brito L.F., Bedere N., Douhard F. et al.* Review: Genetic selection of high-yielding dairy cattle toward sustainable farming systems in a rapidly changing world // *Animal.* 2021. V. 15. P. 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100292>
4. *Белоусов А.И., Красноперов А.С., Опарина О.Ю., Суздальцева М.А.* Метаболические признаки алиментарного кетоза у высокопродуктивных коров // *Труды ВИЭВ.* 2018. Т. 80. № 1. С. 88–100. <https://doi.org/10.30917/ATT-PRINT-2018-1>
5. *Белоусов А.И., Соколова О.В., Беспамятных Е.Н.* Применение биохимического скрининга при оценке продуктивного здоровья высокопродуктивных коров в Свердловской области // *Вопр. нормативно-правового регулирования в ветеринарии.* 2018. Т. 4. С. 278–280. <https://doi.org/10.17238/issn2072-6023.2018.4.278>
6. *Михайлова И.И., Евлевская Е.П., Михайлова О.И. и др.* Патобиохимические изменения в метаболическом статусе высокопродуктивных коров // *Ветеринарная патология.* 2016. Т. 1. № 55. С. 75–80.
7. *Kessel S., Stroehl M., Meyer H.H.D. et al.* Individual variability in physiological adaptation to metabolic stress during early lactation in dairy cows kept under equal conditions // *J. Animal Sci.* 2008. V. 86. № 11. P. 2903–2912. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1016>
8. *van Dorland H.A., Richter S., Morel I. et al.* Variation in hepatic regulation of metabolism during the dry period and in early lactation in dairy cows // *J. Dairy Sci.* 2009. V. 92. № 5. P. 1924–1940. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1454>
9. *Ковалюк Н.В., Якушева Л.И., Кузьминова Е.В. и др.* Связь полиморфизмов гена лептина с предрасположенностью крупного рогатого скота к кетозу // *Генетика и разведение животных.* 2020. Т. 3. С. 20–26. <https://doi.org/10.31043/2410-2733-2020-3-20-26>
10. *Kroezen V., Schenkel F.S., Miglior F. et al.* Candidate gene association analyses for ketosis resistance in Holsteins // *J. Dairy Sci.* 2018. V. 101. № 6. P. 5240–5249. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13374>
11. *Huang H., Cao J., Hanif Q. et al.* Genome-wide association study identifies energy metabolism genes for resistance to ketosis in Chinese Holstein cattle // *Anim. Genet.* 2019. V. 50. № 4. P. 376–380. <https://doi.org/10.1111/age.12802>
12. *Nayeri S., Schenkel F., Fleming A. et al.* Genome-wide association analysis for β -hydroxybutyrate concentration in Milk in Holstein dairy cattle // *BMC Genetics.* 2019. V. 20. № 58. P. 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12863-019-0761-9>
13. *Yan Z., Huang H., Freebern E. et al.* Integrating RNA-Seq with GWAS reveals novel insights into the molec-

- ular mechanism underpinning ketosis in cattle // BMC Genomics. 2020. V. 21. № 489. P. 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-06909-z>
14. Wu Z.L., Chen S.Y., Qin C. *et al.* Clinical ketosis-associated alteration of gene expression in Holstein cows // Genes (Basel). 2020. V. 11. № 219. P. 1–11. <https://doi.org/10.3390/genes11020219>
 15. Mohsin M.A., Yu H., He R. *et al.* Differentiation of sub-clinical ketosis and liver function test indices in adipose tissues associated with hyperketonemia in postpartum dairy cattle // Front. Vet. Sci. 2021. V. 8. P. 1–14. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.796494>
 16. Looor J.J., Everts R.E., Bionaz M. *et al.* Nutrition-induced ketosis alters metabolic and signaling gene networks in liver of periparturient dairy cows // Physiol. Genomics. 2007. V. 32. № 1. P. 105–116. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00188.2007>
 17. Visscher P.M., Wray N.R., Zhang Q. *et al.* 10 Years of GWAS discovery: biology, function, and translation // Am. J. Hum. Genet. 2017. V. 101. № 1. P. 5–22. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.06.005>
 18. Giacomini K.M., Yee S.W., Mushiroda T. *et al.* Genome-wide association studies of drug response and toxicity: An opportunity for genome medicine // Nat. Rev. Drug Discov. 2017. V. 16. № 1. P. 1–3. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.234>
 19. Shu L., Blencowe M., Yang X. Translating GWAS findings to novel therapeutic targets for coronary artery disease // Front. Cardiovasc. Med. 2018. V. 5. P. 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00056>
 20. Hillreiner M., Flinspach C., Pfaffl M.W., Kliem H. Effect of the ketone body beta-hydroxybutyrate on the innate defense capability of primary bovine mammary epithelial cells // PLoS One. 2016. V. 11. № 6. P. 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157774>
 21. Esposito G., Irons P.C., Webb E.C., Chapwanya A. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows // Animal Reproduction Sci. 2014. V. 144. № 3. P. 60–71. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.11.007>
 22. Zhang S., Liu G., Xu C. *et al.* Perilipin 1 mediates lipid metabolism homeostasis and inhibits inflammatory cytokine synthesis in bovine adipocytes // Front. Immunol. 2018. V. 9. P. 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00467>
 23. Ha N.T., Gross J.J., van Dorland A. *et al.* Gene-based mapping and pathway analysis of metabolic traits in dairy cows // PLoS One. 2015. V. 10. № 3. P. 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122325>
 24. Soares R.A.N., Vargas G., Muniz M.M.M. *et al.* Differential gene expression in dairy cows under negative energy balance and ketosis: A systematic review and meta-analysis // J. Dairy Sci. 2021. V. 104. № 1. P. 602–615. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18883>
 25. McLaren W., Gil L., Hunt S.E. *et al.* The Ensembl Variant Effect Predictor // Genome Biology. 2016. V. 17. № 1. P. 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0974-4>
 26. Huang D., Ovcharenko I. Identifying causal regulatory SNPs in ChIP-seq enhancers // Nucl. Acids Res. 2015. V. 43. № 1. P. 225–236. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1318>
 27. Calvo S.E., Pagliarini D.J., Mootha V.K. Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. № 18. P. 7507–7512. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810916106>
 28. Chen J., Tian W. Explaining the disease phenotype of intergenic SNP through predicted long range regulation // Nucl. Acids Res. 2016. V. 44. № 18. P. 8641–8654. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw519>
 29. Schmidt S.F., Larsen B.D., Loft A. *et al.* Acute TNF-induced repression of cell identity genes is mediated by NFκB-directed redistribution of cofactors from super-enhancers // Genome Research. 2015. V. 25. № 9. P. 1281–1294. <https://doi.org/10.1101/gr.188300.114>
 30. Vlahopoulos S.A. Aberrant control of NF-κB in cancer permits transcriptional and phenotypic plasticity, to curtail dependence on host tissue: molecular mode // Cancer Biology & Medicine. 2017. V. 14. № 3. P. 254–270. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2017.0029>
 31. Birney E., Stamatoyannopoulos J.A., Dutta A. *et al.* Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project // Nature. 2007. V. 447. P. 799–816. <https://doi.org/10.1038/nature05874>
 32. Mucaki E.J., Shirley B.C., Rogan P.K. Expression changes confirm genomic variants predicted to result in allele-specific, alternative mRNA splicing // Front. Genet. 2020. V. 11. P. 1–16. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00109>
 33. Kalsotra A., Cooper T.A. Functional consequences of developmentally regulated alternative splicing // Nat. Rev. Genet. 2011. V. 12. № 10. P. 715–729. <https://doi.org/10.1038/nrg3052>
 34. Chasman D., Adams R.M. Predicting the functional consequences of non-synonymous single nucleotide polymorphisms: Structure-based assessment of amino acid variation // J. Mol. Biol. 2001. V. 307. № 2. P. 683–706. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4510>
 35. Dakal T.C., Kala D., Dhiman G. *et al.* Predicting the functional consequences of non-synonymous single nucleotide polymorphisms in IL8 gene // Scientific Reports. 2017. V. 7. № 1. P. 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06575-4>
 36. Sharma J., Keeling K.M., Rowe S.M. Pharmacological approaches for targeting cystic fibrosis nonsense mutations // Eur. J. Med. Chem. 2020. V. 200. P. 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112436>
 37. Petersen G.M., Parmigiani G., Thomas D. Missense mutations in Disease Genes: A Bayesian Approach to

- Evaluate Causality // *Am. J. Human Genet.* 1998. V. 62. № 6. P. 1516–1524.
<https://doi.org/10.1086/301871>
38. *van der Velden A.W., Thomas A.A.* The role of the 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1999. V. 31. № 1. P. 87–106.
[https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(98\)00134-4](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(98)00134-4)
39. *Jansen Ralf-P.* mRNA localization: message on the move // *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* 2001. V. 2. № 4. P. 247–256.
<https://doi.org/10.1038/35067016>
40. *Bashirullah A., Cooperstock R.L., Lipshitz H.D.* Spatial and temporal control of RNA stability // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. № 13. P. 7025–7028.
<https://doi.org/10.1073/pnas.111145698>
41. *Jiang H., Lucy M.C.* Variants of the 5'-untranslated region of the bovine growth hormone receptor mRNA: Isolation, expression and effects on translational efficiency // *Gene.* 2001. V. 265. № 1. P. 45–53.
[https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(01\)00356-0](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(01)00356-0)
42. *Hu L., Ma Y., Liu L. et al.* Detection of functional polymorphisms in the hsp70 gene and association with cold stress response in Inner-Mongolia Sanhe cattle // *Cell Stress and Chaperones.* 2019. V. 24. № 2. P. 409–418.
<https://doi.org/10.1007/s12192-019-00973-5>
43. *Dhamija S., Menon M.B.* Non-coding transcript variants of protein-coding genes – what are they good for? // *RNA Biology.* 2018. V. 15. № 8. P. 1025–1031.
<https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1511675>
44. *Nelson C.D., Reinhardt T.A., Thacker T.C. et al.* Modulation of the bovine innate immune response by production of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 in bovine monocytes // *J. Dairy Sci.* 2010. V. 93. № 3. P. 1041–1049.
<https://doi.org/10.3168/jds.2009-2663>
45. *Yu-fei S., Liu J., Wang X. et al.* Essential role of the first intron in the transcription of hsp90 β gene // *FEBS Letters.* 1997. V. 413. № 1. P. 92–98.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00883-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00883-1)
46. *Jo B., Choi S.S.* Introns: The functional benefits of introns in genomes // *Genomics Inform.* 2015. V. 13. № 4. P. 112–118.
<https://doi.org/10.5808/GI.2015.13.4.112>
47. *Huang D., Chowdhury S., Wang H. et al.* Multiomic analysis identifies CPT1A as a potential therapeutic target in platinum-refractory, high-grade serous ovarian cancer // *Cell Reports Med.* 2021. V. 2. № 12. P. 1–32.
<https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100471>
48. *Ren Q., Guo M., Yang F. et al.* Association of CPT1A gene polymorphism with the risk of gestational diabetes mellitus: A case-control study // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2021. V. 38. № 7. P. 1861–1869.
<https://doi.org/10.1007/s10815-021-02143-y>
49. *Mayr C.* What are 3' UTRs doing? // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2019. V. 11. № 10. P. 1–17.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034728>
50. *Chekulaeva M., Landthaler M.* Eyes on translation // *Mol. Cell.* 2016. V. 63. № 6. P. 918–925.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.08.031>
51. *Mayr C.* Regulation by 3'-untranslated regions // *Annu. Rev. Genet.* 2017. V. 51. P. 171–194.
<https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120116-024704>
52. *Szklarczyk D., Gable A.L., Nastou K.C. et al.* The STRING database in 2021: Customizable protein–protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets // *Nucl. Acids Res.* 2021. V. 49. № D1. P. 605–612.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1074>
53. *Freed A.S., Schwarz A.C., Brei B.K. et al.* CHRNB1-associated congenital myasthenia syndrome: Expanding the clinical spectrum // *Am. J. Med. Genetics. Part A.* 2021. V. 185. № 3. P. 827–835.
<https://doi.org/10.1002/ajmg.a.62011>
54. *Andre E., Beckerandre M.* Expression of an N-terminally truncated form of human focal adhesion kinase in brain // *Biochem. Biophys. Res. Communications.* 1993. V. 190. № 1. P. 140–147.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.1022>
55. *Li M., Zhong Di, Li G.* Regulatory role of local tissue signal Del-1 in cancer and inflammation: a review // *Cellular & Mol. Biol. Letters.* 2021. V. 26. № 1. P. 1–12.
<https://doi.org/10.1186/s11658-021-00274-9>
56. *Hsiao C.T., Cheng H.W., Huang C.M. et al.* Fibronectin in cell adhesion and migration via N-glycosylation // *Oncotarget.* 2017. V. 8. № 41. P. 70653–70668.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.19969>
57. *Dutta S., Mana-Capelli S., Paramasivam M. et al.* TRIP6 inhibits Hippo signaling in response to tension at adherens junctions // *EMBO Reports.* 2018. V. 19. № 2. P. 337–350.
<https://doi.org/10.15252/embr.201744777>
58. *Warfel J.D., Vandanmagsar B., Dubuisson O.S. et al.* Examination of carnitine palmitoyltransferase 1 abundance in white adipose tissue: Implications in obesity research // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2017. V. 312. № 5. P. 816–820.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00520.2016>
59. *Price N.T., Jackson V.N., Müller J. et al.* Alternative exon usage in the single CPT1 gene of *Drosophila* generates functional diversity in the kinetic properties of the enzyme: Differential expression of alternatively spliced variants in *Drosophila* tissues // *J. Biol. Chemistry.* 2010. V. 285. № 11. P. 7857–7865.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.072892>
60. *Riancho J.A., Vázquez L., García-Pérez M.A. et al.* Association of ACACB polymorphisms with obesity and diabetes // *Mol. Genet. Metabolism.* 2011. V. 104. № 4. P. 670–676.
<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.08.013>
61. *Hellwege J.N., Stallings S., Torstenson E.S. et al.* Heritability and genome-wide association study of benign prostatic hyperplasia (BPH) in the eMERGE network //

- Sci. Rep. 2019. V. 9. № 1. P. 1–10.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-42427-z>
62. Lao-On U., Cliff T.S., Dalton S., Jitrapakdee S. Pyruvate carboxylase supports basal ATP-linked respiration in human pluripotent stem cell-derived brown adipocytes // *Biochem. Biophys. Res. Communications*. 2021. V. 569. P. 139–146.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.06.096>
 63. Rossi S.M., Konstantinidou G. Targeting long chain acyl-CoA synthetases for cancer therapy // *Int. J. Mol. Sci*. 2019. V. 20. № 15.
<https://doi.org/10.3390/ijms20153624>
 64. Lee K., Kerner J., Hoppel C.L. Mitochondrial carnitine palmitoyltransferase 1a (CPT1a) is part of an outer membrane fatty acid transfer complex // *J. Biol. Chem*. 2011. V. 286. № 29. P. 25655–25662.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.228692>
 65. Nickkho-Amiry M., McVey R., Holland C. Peroxisome proliferator-activated receptors modulate proliferation and angiogenesis in human endometrial carcinoma // *Mol. Cancer Res*. 2012. V. 10. № 3. P. 441–453.
<https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-11-0233>
 66. Mostaghel E.A., Cho E., Zhang A. et al. Association of tissue abiraterone levels and SLCO genotype with intraprostatic steroids and pathologic response in men with high-risk localized prostate cancer // *Clin. Cancer Res*. 2017. V. 23. № 16. P. 4592–4601.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-2245>
 67. Lu X., Chan T., Cheng Z. et al. The 5'-AMP-activated protein kinase regulates the function and expression of human organic anion transporting polypeptide 1A2 // *Mol. Pharmacology*. 2018. V. 94. № 6. P. 1–9.
<https://doi.org/10.1124/mol.118.113423>
 68. Nayeri S., Stothard P. Tissues, metabolic pathways and genes of key importance in lactating dairy cattle // *Springer Sci. Rev*. 2016. V. 4. № 2. P. 49–77.
<https://doi.org/10.1007/s40362-016-0040-3>
 69. Boyle E.I., Weng S., Gollub J. et al. GO::TermFinder – open source software for accessing Gene Ontology information and finding significantly enriched Gene Ontology terms associated with a list of genes // *Bioinformatics*. 2004. V. 20. № 18. P. 3710–3715.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth456>
 70. Supek F., Bošnjak M., Škunca N., Šmuc T. REVIGO summarizes and visualizes long lists of Gene Ontology terms // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 7. P. 1–9.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021800>
 71. Zhang G., Hailemariam D., Dervishi E. et al. Dairy cows affected by ketosis show alterations in innate immunity and lipid and carbohydrate metabolism during the dry off period and postpartum // *Res. Veterinary Sci*. 2016. V. 107. P. 246–256.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.06.012>
 72. Gulinski P. Ketone bodies – causes and effects of their increased presence in cows' body fluids: A review // *Vet. World*. 2021. V. 14. № 6. P. 1492–1503.
<https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1492-1503>
 73. Wang Y., Gao Y., Xia C. et al. Pathway analysis of plasma different metabolites for dairy cow ketosis // *Italian J. Animal Sci*. 2016. V. 15. № 3. P. 545–551.
<https://doi.org/10.1080/1828051X.2016.1180643>
 74. Zhang G., Ametaj B.N. Ketosis an old story under a new approach // *Dairy*. 2020. V. 1. № 1. P. 42–60.
<https://doi.org/10.3390/dairy1010005>
 75. Dufour D.R., Lott J.A., Nolte F.S. et al. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. II. Recommendations for use of laboratory tests in screening, diagnosis, and monitoring // *Clin. Chem*. 2000. V. 46. № 12. P. 2050–2068.
<https://doi.org/10.1093/clinchem/46.12.2050>
 76. Tsukamoto K., Teramoto T. Carbohydrate and lipid metabolism in liver cirrhosis // *Nihon Rinsho*. 1994. V. 52. № 1. P. 150–158.
 77. Natesan V., Kim S.J. Lipid metabolism, disorders and therapeutic drugs – review // *Biomol. Ther. (Seoul)*. 2021. V. 29. № 6. P. 596–604.
<https://doi.org/10.4062/biomolther.2021.122>
 78. McCabe M., Waters S., Morris D. et al. RNA-seq analysis of differential gene expression in liver from lactating dairy cows divergent in negative energy balance // *BMC Genomics*. 2012. V. 13. P. 1–11.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-193>
 79. Carithers L.J., Moore H.M. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project // *Biopreserv. Biobank*. 2015. V. 13. № 5. P. 307–308.
<https://doi.org/10.1038/ng.2653>
 80. Goldinger A., Henders A.K., McRae A.F. et al. Genetic and nongenetic variation revealed for the principal components of human gene expression // *Genetics*. 2013. V. 195. № 3. P. 1117–1128.
<https://doi.org/10.1534/genetics.113.153221>
 81. Genin E., Feingold J., Clerget-Darpoux F. Identifying modifier genes of monogenic disease: strategies and difficulties // *Hum. Genet*. 2008. V. 124. № 4. P. 357–368.
<https://doi.org/10.1007/s00439-008-0560-2>
 82. Wright G.E.B., Caron N.S., Ng B. et al. Gene expression profiles complement the analysis of genomic modifiers of the clinical onset of Huntington disease // *Hum. Mol. Genet*. 2020. V. 29. № 16. P. 2788–2802.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddaa184>
 83. Shahzad K., Lopreiato V., Liang Y. et al. Hepatic metabolomics and transcriptomics to study susceptibility to ketosis in response to prepartal nutritional management // *J. Anim. Sci. Biotechnol*. 2019. V. 10. P. 96.
<https://doi.org/10.1186/s40104-019-0404-z>
 84. Pralle R.S., Li W., Murphy B.N. et al. Novel facets of the liver transcriptome are associated with the susceptibility and resistance to lipid-related metabolic disorders in periparturient Holstein cows // *Animals (Basel)*. 2021. V. 11. № 9. P. 1–22.
<https://doi.org/10.3390/ani11092558>
 85. Mezzetti M., Cattaneo L., Passamonti M.M. et al. The transition period updated: A review of the new insights into the adaptation of dairy cows to the new lactation //

- Dairy. 2021. V. 2. № 4. P. 617–636.
<https://doi.org/10.3390/dairy2040048>
86. Cuiyu Z., Chang Z., Jiang Z. *et al.* The relationship between insulin resistance and type II ketosis in dairy cows // *Acta Scientiae Veterinariae*. 2019. V. 47. № 1. P. 1–8.
<https://doi.org/10.22456/1679-9216.93425>
 87. Klein S.L., Scheper C., Brügemann K. *et al.* Phenotypic relationships, genetic parameters, genome-wide associations, and identification of potential candidate genes for ketosis and fat-to-protein ratio in German Holstein cows // *J. Dairy Sci.* 2019. V. 102. № 7. P. 6276–6287.
<https://doi.org/10.3168/jds.2019-16237>
 88. Heringstad B., Chang Y.M., Gianola D., Klemetsdal G. Genetic analysis of clinical mastitis, milk fever, ketosis, and retained placenta in three lactations of Norwegian red cows // *J. Dairy Sci.* 2005. V. 88. № 9. P. 3273–3281.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73010-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73010-1)
 89. Koeck A., Jamrozik J., Schenkel F.S. *et al.* Genetic analysis of milk β -hydroxybutyrate and its association with fat-to-protein ratio, body condition score, clinical ketosis, and displaced abomasum in early first lactation of Canadian Holsteins // *J. Dairy Sci.* 2014. V. 97. № 11. P. 7286–7292.
<https://doi.org/10.3168/jds.2014-8405>
 90. Blanco-Gómez A., Castillo-Lluva S., Del Mar S.F.M. *et al.* Missing heritability of complex diseases: Enlightenment by genetic variants from intermediate phenotypes // *BioEssays*. 2016. V. 38. № 7. P. 664–673.
<https://doi.org/10.1002/bies.201600084>
 91. Belay T.K., Svendsen M., Kowalski Z.M., Ådnøy T. Genetic parameters of blood β -hydroxybutyrate predicted from milk infrared spectra and clinical ketosis, and their associations with milk production traits in Norwegian Red cows // *J. Dairy Sci.* 2017. V. 100. № 8. P. 6298–6311.
<https://doi.org/10.3168/jds.2016-12458>
 92. Oreland L., Lagravinese G., Toffoletto S. *et al.* Personality as an intermediate phenotype for genetic dissection of alcohol use disorder // *J. Neural. Transm. (Vienna)*. 2018. V. 125. № 1. P. 107–130.
<https://doi.org/10.1007/s00702-016-1672-9>
 93. Zuk O., Hechter E., Sunyaev S.R., Lander E.S. The mystery of missing heritability: Genetic interactions create phantom heritability // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. № 4. P. 1193–1198.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1119675109>
 94. Marian A.J. Elements of missing heritability // *Curr. Opin. Cardiol.* 2012. V. 27. № 3. P. 197–201.
<https://doi.org/10.1097/HCO.0b013e328352707d>
 95. van Calker D., Serchov T. The “missing heritability”—problem in psychiatry: Is the interaction of genetics, epigenetics and transposable elements a potential solution? // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2021. V. 126. P. 23–42.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.03.019>
 96. Manolio T.A., Collins F.S., Cox N.J. *et al.* Finding the missing heritability of complex diseases // *Nature*. 2009. V. 461. № 7265. P. 747–753.
<https://doi.org/10.1038/nature08494>
 97. Genin E. Missing heritability of complex diseases: case solved? // *Hum. Genet.* 2020. V. 139. № 1. P. 103–113.
<https://doi.org/10.1007/s00439-019-02034-4>
 98. Wagner G.P., Zhang J. The pleiotropic structure of the genotype-phenotype map: the evolvability of complex organisms // *Nat. Rev. Genet.* 2011. V. 12. № 3. P. 204–213.
<https://doi.org/10.1038/nrg2949>
 99. Li Y., Huang J., Amos C.I. Genetic association analysis of complex diseases incorporating intermediate phenotype information // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 10. P. 1–9.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046612>
 100. Hackinger S., Zeggini E. Statistical methods to detect pleiotropy in human complex traits // *Open Biol.* 2017. V. 7. № 11. P. 1–13.
<https://doi.org/10.1098/rsob.170125>
 101. Bone W.P., Siewert K.M., Jha A. *et al.* Multi-trait association studies discover pleiotropic loci between Alzheimer's disease and cardiometabolic traits // *Alzheimers Res. Ther.* 2021. V. 13. P. 1–14.
<https://doi.org/10.1186/s13195-021-00773-z>
 102. Якушева Л.И., Абрамов А.А., Ковалюк Н.В., Сацук В.Ф. Связь полиморфизмов R25C и A80V гена лептина быков-производителей с оценкой их дочерей на предрасположенность к возникновению кетоза // *Сб. науч. трудов Краснодарского науч. центра по зоотехнии и ветеринарии*. 2019. Т. 8. № 3. С. 24–27.
<https://doi.org/10.34617/y47d-6h82>
 103. Komisarek J. Impact of LEP and LEPR gene polymorphisms on functional traits in Polish Holstein-Friesian cattle // *Anim. Sci. Pap. Rep.* 2010. V. 28.
 104. Mahmoudi A., Zargaran A., Amini H.R. *et al.* A SNP in the 3'-untranslated region of AMPKgamma1 may associate with serum ketone body and milk production of Holstein dairy cows // *Gene*. 2015. V. 574. № 1. P. 48–52.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.07.077>
 105. Yang L., Bai J., Ju Z. *et al.* Effect of functional single nucleotide polymorphism g.-572 A>G of apolipoprotein A1 gene on resistance to ketosis in Chinese Holstein cows // *Res. Vet. Sci.* 2021. V. 135. P. 310–316.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.10.006>
 106. Tetens J., Heuer C., Heyer I. *et al.* Polymorphisms within the APOBR gene are highly associated with milk levels of prognostic ketosis biomarkers in dairy cows // *Physiol. Genomics*. 2015. V. 47. № 4. P. 129–137.
<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00126.2014>

Genetic Susceptibility to Ketosis in Cattle: Current State of Research

O. V. Sokolova^{a, *}, M. V. Bytov^a, A. I. Belousov^a, N. A. Bezborodova^a,
V. D. Zubareva^a, N. A. Martynov^a, O. S. Zaitseva^a, and I. A. Shkuratova^a

^a*Ural Federal Agrarian Scientific Research Centre, Ural Branch
of Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, 620142 Russia*

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

High-yield productivity in dairy cows is due to intense functioning of all organs and organism systems, that predisposes animals to various forms of disorders of metabolic processes. Progress of energy disbalance in high-yield dairy cows during lactation contributes to the development of systemic metabolic disorders, negatively affecting milk production and reproductive potential of animals. Interest in breeding ketosis resistant cattle is global and finding of mutations, gene variants and molecular and genetic processes contributing to one or another phenotype are considered as key steps in understanding a degree of susceptibility to ketosis. These steps will also give an insight in etiology of ketosis and provide basis for designing novel effective breeding programs. In this paper we present an overview of studies based on genetic and molecular research methods in finding genetic markers of cattle ketosis development. We discuss comprehensive SNPs localization of GWAS meta-analysis data, protein-protein interactions of associated with SNPs candidate genes via STRING, as well as SNPs annotation of associated biological processes. We provide candidate gene expression profiles for associated with ketosis tissues based on human data with GTEx tool.

Keywords: ketosis, dairy cattle, genetic studies, GWAS, missing heritability, beta-hydroxybutyrate.

САЙТЫ СВЯЗЫВАНИЯ АРХИТЕКТУРНОГО БЕЛКА Su(Hw) СТИМУЛИРУЮТ РЕКРУТИРОВАНИЕ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕГУЛЯТОРОВ PcG/TrxG НА ХРОМАТИН: CRISPR/Cas9-ТЕСТ

© 2023 г. М. М. Ерохин¹, *, Ф. В. Горбенко¹, Д. В. Ломаев¹, Д. А. Четверина¹, **

¹Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

*e-mail: yermaxbio@yandex.ru

**e-mail: daria.chetverina@gmail.com

Поступила в редакцию 17.04.2022 г.

После доработки 29.05.2022 г.

Принята к публикации 09.06.2022 г.

Белки групп Polycomb и Trithorax (PcG и TrxG) являются эпигенетическими факторами, отвечающими за репрессию и активацию транскрипции соответственно. У *Drosophila* белки PcG/TrxG рекрутируются на специализированные ДНК-элементы, называемые PRE (Polycomb response elements). В зависимости от контекста, данные элементы могут репрессировать, активировать или быть нейтральными по отношению к промотору гена-мишени. Ранее в трансгенных исследованиях с использованием PhiC31 сайт-специфической системы интеграции мы продемонстрировали, что расположенные рядом с PRE сайты для архитектурных белков могут индуцировать репрессорную активность *bxd*PRE, стимулируя связывание факторов PcG/TrxG с данным элементом. Однако этот эффект может зависеть от дополнительных ДНК-элементов, присутствующих в месте интеграции после PhiC31-зависимой инсерции трансгенов. В настоящем исследовании, используя альтернативную систему интеграции на основе CRISPR/Cas9-катализируемой гомологичной репарации, мы доказали, что сайты связывания архитектурного белка Su(Hw) действительно способны индуцировать репрессорную активность *bxd*PRE и привлечение белков PcG/TrxG вне зависимости от дополнительных ДНК-элементов, присутствующих в месте интеграции после PhiC31-зависимой инсерции трансгенов.

Ключевые слова: *Drosophila*, Polycomb, PRE-элемент, репрессия транскрипции, CRISPR/Cas9.

DOI: 10.31857/S0016675823030049, **EDN:** INYMCX

Эпигенетический контроль активности генов является необходимым для дифференцировки клеток и поддержания правильных паттернов экспрессии на взрослой стадии у многоклеточных организмов. Ключевые регуляторы данного процесса — белки групп Polycomb и Trithorax — являются репрессорами и активаторами транскрипции соответственно [1–3]. Нарушение работы данных факторов приводит к различным патологиям, включая онкологические заболевания, что определяет необходимость исследований, направленных на изучение механизма их действия [4–8].

Одним из нерешенных на сегодняшний день вопросов, является понимание механизма рекрутирования белков PcG/TrxG на хроматин. Репрессоры PcG представлены тремя основными белковыми комплексами — PRC1, PRC2 и PhoRC, тогда как активаторы TrxG более разнообразны и включают метилтрансферазные комплексы COMPASS и COMPASS-like, ремоделеры хроматина SWI/SNF и другие (подробнее см. [4]). У *Drosophila* белки PcG/TrxG привлекаются на специализированные

ДНК-регуляторные элементы, названные Polycomb response elements (PRE) [9, 10]. Многочисленные эксперименты с трансгенными конструкциями, интегрированными в геном, показали, что PRE могут подавлять экспрессию репортерных генов и поддерживать репрессию во время развития.

Характерной чертой PRE-зависимой репрессии является эффект, названный pairing-sensitive silencing (PSS), который заключается в том, что репрессия становится намного сильнее у мух, гомозиготных по трансгену [11, 12]. Считается, что усиление репрессии у гомозигот связано с транс-взаимодействиями между двумя копиями PRE, находящихся на гомологичных хромосомах. PSS-эффект также наблюдался для PREs в их эндогенном контексте [13].

Кроме того показано, что активность PRE-элементов в составе трансгенов сильно зависит от окружающего хроматина. В зависимости от сайта интеграции PREs могут репрессировать или активировать транскрипцию репортерных генов, либо же быть нейтральным элементом, не оказывая вли-

яния на экспрессию гена [11, 14–17]. Это указывает на то, что активность PRE модулируется хромосомным контекстом. Однако детали данного процесса и факторы влияния на активность PRE практически не изучены.

Ранее мы показали, что сайты связывания для архитектурных белков, расположенные рядом с PRE-элементом, могут усиливать PRE-опосредованную репрессию и, более того, индуцировать репрессионную активность неактивного PRE [16]. В частности, данный эффект был показан на модельной системе, содержащей четыре сайта связывания для архитектурного белка Su(Hw), PRE-элемента *bxd*PRE из регуляторной области гена *Ubx*, репортерный ген *white* и attB-сайт. Сайт attB необходим для интеграции конструкции в геном с помощью направленной сайт-специфической рекомбинации PhiC31 [18]. При PhiC31-опосредуемой интеграции происходит рекомбинация между сайтом attB трансгена и встроенным в определенное место генома сайтом attP. При этом при встраивании происходит интеграция как тестируемых последовательностей ДНК, так и дополнительных последовательностей, необходимых для наработки плазмиды в бактериях. Кроме того, в геноме рядом с трансгеном присутствуют фрагменты трансгенного элемента Mariner, за счет которого был интегрирован сайт attP [18]. Таким образом, способность сайтов связывания архитектурных белков активировать репрессионную активность PRE потенциально может зависеть от участков ДНК, необходимых для PhiC31-зависимой интеграции конструкции в геном.

Настоящее исследование направлено на проверку способности сайтов связывания архитектурных белков стимулировать активность PRE независимо других ДНК-регуляторных элементов. Для этого была проведена CRISPR/Cas9-зависимая инсерция только внутренних элементов конструкции в геномную область без последовательностей элемента Mariner и attP. В результате анализа было показано, что стимулирование репрессионной активности *bxd*PRE сайтами Su(Hw) сохраняется при CRISPR/Cas9-зависимой интеграции конструкции. Более того, репрессия сопровождается рекрутированием ДНК-связывающего фактора PRE — Combgap, и белками PcG/TrxG на PRE. Таким образом, стимуляция PRE-опосредованной репрессионной активности *bxd*PRE сайтами Su(Hw) не зависит от присутствующих в геноме после PhiC31-зависимой интеграции элементов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для интеграции трансгенной конструкции в геном (область 96E на третьей хромосоме) мы использовали систему гомологичной рекомбинации, индуцируемой созданием двуцепочечных разрывов с помощью CRISPR/Cas9 системы [19].

Для этого были сделаны следующие плазмиды: 1) CRISPR-96E — плазида, экспрессирующая гидовую РНК (gRNA) к геномной области 96E; 2) HR-Su(Hw)-bxd — конструкция, содержащая исследуемые ДНК-регуляторные элементы и участки для гомологичной рекомбинации.

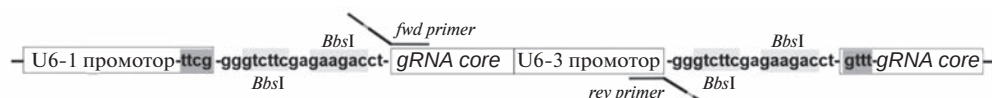
Создание плазмиды 96E-CRISPR

Для выбора оптимальных сайтов-мишеней gRNA к геномной области 96E использовалась онлайн-программа поиска мишеней flyCRISPR (<https://flycrispr.org/>) [20]. Для более эффективной интеграции были выбраны две пары gRNA: первая пара — 5'-96E-CRISPR1 — 5'-aaagcagcatgga-taccacc-3' и 3'-96E-CRISPR1 — 5'-aagatgtcgcacaaacg-gct-3'; вторая пара — 5'-96E-CRISPR2 — 5'-accacctgg-cccattggatt-3' и 3'-96E-CRISPR2 — 5'-atggataccacctgg-cccat-3'. 5'- и 3'-96E-CRISPR были одновременно с помощью ПЦП вставлены в вектор для двойной экспрессии CRISPRs — prAc_yiless_U6:1:3_attB [21], под контроль промоторов U6:1 и U6:3 соответственно (см. далее рис. 1). Вектор prAc_yiless_U6:1:3_attB [21] основан на плазмиде pCFD4-U6:1_U6:3tandemgRNAs (Addgene # 49411 [19]) с дополнительной вставкой гена yellow-intron-less-attB под контролем промотора Actin5C. Ген *yellow* и attB в данной работе не использовались, в плазмиде они присутствуют для возможности стабильной интеграции плазмид с gRNA в геном.

Для одновременного клонирования 5'- и 3'-96E-CRISPR были подобраны прямой и обратный праймеры, которые также содержат гомологию с вектором prAc_yiless_U6:1:3_attB для ПЦП-амплификации с данного участка. Праймеры для первой пары для создания плазмиды 96E-CRISPR1: 5'-gagaagacctTTCGgAAAGCAGCATGGATACCAC-CGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG-3' и 5'-gagaagacctAAACAGCCGTTTTGCGACATACTTc-GACGTTAAATTGAAAATAGGTC-3'. Праймеры для второй пары для создания плазмиды 96E-CRISPR2: 5'-gagaagacctTTCGgACCACCTGGCCCCATTG-GATTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG-3' и 5'-gagaagacctAAACATGGGCCAGGTGGTATCCATc-GACGTTAAATTGAAAATAGGTC-3'.

Кроме gRNA, праймеры содержат сайты для эндонуклеазы рестрикции *Bbs*I и спейсеры, необходимые для клонирования. *Bbs*I распознает 5'-GAAGACN2↓-3'/3'-СТТСТGN6↑-5', присутствующий в 5'-части праймера. Сайты для *Bbs*I также присутствуют в векторе prAc_yiless_U6:1:3_attB. Продукты ПЦП, обработанные эндонуклеазой рестрикции *Bbs*I, были вставлены в вектор prAc_yiless_U6:1:3_attB, расщепленный по *Bbs*I. Правильное лигирование последовательностей в результирующих векторах 96E-CRISPR1 и 96E-CRISPR2 было подтверждено секвенированием.

а Фрагмент вектора pAc_yiless_U6:1:3_attB



Праймеры для клонирования плазмиды 96E-CRISPR1:

Прямой праймер fwd:

5'-gagaagacctt(1)-G(2)-AAAGCAGCATGGATACCACC (5'-96E-CRISPR1)-GTTTATAGCTAGAAATAGCAAG (3)-3'

Обратный праймер rev:

5'-gagaagaccta(1)-AGCCGTTTTCGACATACCTT (комплементарно 3'-96E-CRISPR1)-C(2)-GACGTTAAATTGAAAATAGGTC (4)-3'

Праймеры для клонирования плазмиды 96E-CRISPR2:

Прямой праймер fwd:

5'-gagaagacctt(1)-G(2)-ACCACCTGGCCATTGGATT (5'-96E-CRISPR2)-GTTTATAGCTAGAAATAGCAAG (3)-3'

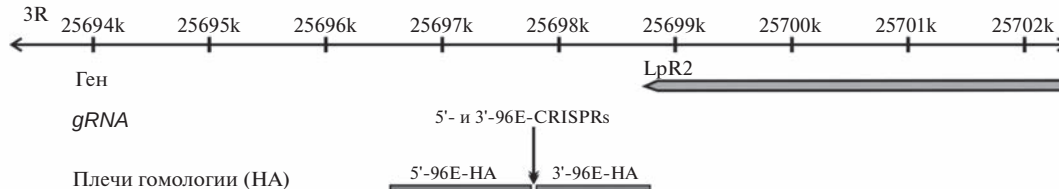
Обратный праймер rev:

5'-gagaagaccta(1)-ATGGGCCAGGTGGTATCCAT (комплементарно 3'-96E-CRISPR2)-C(2)-GACGTTAAATTGAAAATAGGTC (4)-3'

Описание структуры праймеров:

- (1) – BbsI сайт – выделен светло-серым; спейсер для рестрикции-лигирования – выделен темно-серым
- (2) – G (или C в обратном праймере) – необходим для транскрипции с U6 промоторов
- (3) – соответствует фрагменту gRNA core
- (4) – соответствует фрагменту U6:3 промотора

б



в

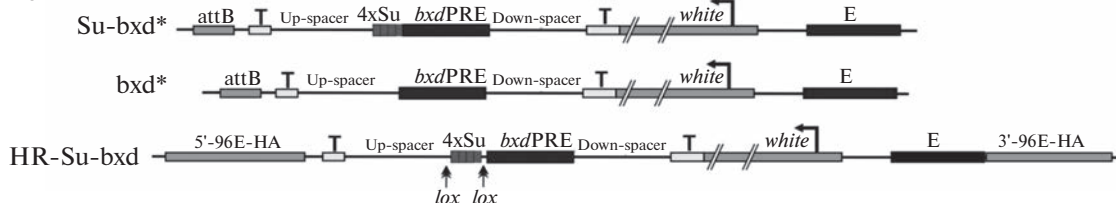


Рис. 1. Дизайн эксперимента. *а* – схема создания векторов для экспрессии гидовых РНК (gRNA), подробное описание см. в тексте. *б* – область 96Е, использованная для встройки полученной конструкции. Вертикальной стрелкой указано место после окончания транскрипции гена *LpR2*, в которое производилась интеграция трансгена. Справа и слева – области, использованные в качестве плеч гомологий. *в* – схемы конструкций *bxd*, и *Su-bxd* и *HR-Su-bxd*. * – из [16]. Обозначения: “attB” – сайт attB, необходимый для PhiC31-зависимой интеграции конструкции в геном; “bxdPRE” – сайленсер *bxdPRE*; “4xSu” – четыре сайта связывания белка Su(Hw); *white* – репортерный ген; “E” – энхансер гена *white*; “T” – терминаторы транскрипции; 5'-96E-HA и 3'-96E-HA – плечи гомологии, необходимые для CRISPR/Cas9-зависимой интеграции конструкции в геном. Внутренние функциональные элементы конструкции *HR-Su-bxd* полностью повторяют элементы конструкции *Su-bxd*, но четыре сайта связывания белка Su(Hw) (4xSu) фланкированы сайтами lox (указаны стрелками снизу), для их делеции *in vivo* и получения аналога конструкции *bxd*.

Создание плазмиды HR-Su-bxd

Для создания плазмиды *HR-Su-bxd* *Bam*HI-*Apa*I фрагмент 4xSu из плазмиды lox(Sx4) [22] был встроен в вектор *bxd* [16], обработанный сайтами эндонуклеаз рестрикции *Spe*I и *Xho*I (конструкция *Su-lox-bxd*). Плечи гомологии области 96Е, окружающие сайты-мишени 96Е-CRISPR, были амплифицированы методом ПЦР, используя в качестве матрицы геномную ДНК *D. melanogaster* дикого типа и следующие праймеры:

1) 5'-GGTACCCTAACCTTGTGTGCATGT-3' и 5'-GGTACCACCAAATGGCAAAACACT-3' для плеча гомологии 5'-96Е-HA с сайтами для эндонуклеазы рестрикции *Kpn*I (итоговая длина области гомологии 1170 пн),

2) 5'-CCGCGGGGATCATATCTAAATTGA-3' и 5'-CCGCGGTGAAACAAAATATTAGCT-3' для плеча гомологии 3'-96Е-HA с сайтами для эндонуклеазы рестрикции *Sac*II (итоговая длина области гомологии 980 пн).

Для получения итоговой конструкции HR-Su-bxd полученные фрагменты плечей гомологии 5'- и 3'-96E-НА последовательно вставляли в плазмиду Su-lox-bxd. ПЦР-фрагмент, содержащий плечо 5'-96E-НА, был встроен по сайту *KpnI*. ПЦР-фрагмент, содержащий плечо 3'-96E-НА, был встроен по сайту *SacII*, в результате чего удалялась функциональная область участка attB.

Инъекция эмбрионов и получение трансгенных линий

Смесь плазмид (10 : 1 — HR-Su-bxd : 96E-CRISPR, общая концентрация 500 нг/мкл) вводили в эмбрионы линии #58492 Bloomington *Drosophila* Stock Center, экспрессирующие ген *Cas9* под контролем промотора Actin5C. Инъекцированные эмбрионы выращивали до зрелого возраста и скрещивали с мухами линии y-w¹¹¹⁸. Мух с встройками конструкции HR-Su-bxd идентифицировали по цвету глаз за счет экспрессии гена *white*. Найденных трансформантов скрещивали с линией, несущей балансёр TM3,Sb на третьей хромосоме и в дальнейшем переводили в гомозиготное состояние по трансгену.

Правильность гомологичной рекомбинации была подтверждена с помощью ПЦР с использованием ДНК, выделенной из трансгенных мух. Для получения производной линии HR-bxd с делецией сайтов связывания архитектурного белка Su(Hw), мух с конструкцией HR-Su-bxd скрещивали с линией y^{1w1}; Cyo, P(w⁺,cre)/Sco; +, экспрессирующей Cre-рекомбиназу [23]. Фенотипы трансгенных линий мух HR-Su-bxd и HR-bxd анализировали в геми- (P/+) и гомозиготном (P/P) состояниях. Всех мух содержали при 25°C на стандартной среде.

Иммунопреципитация хроматина (X-ChIP)

Метод иммунопреципитации хроматина проводился как описано в [16]. Хроматин был выделен из голов взрослых мух (150–200 мг) и иммунопреципитирован с помощью специфичных либо неспецифичных антител. В качестве специфичных антител были использованы ранее полученные кроличьи поликлональные антитела к белкам Su(Hw) (C-конец) [24], Ph, Sfmtb, Trx-N [25, 26], Combgap [16]. В качестве неспецифичных антител были использованы IgG не иммунизированного животного. Анализ обогащения был проведен с помощью ПЦР в реальном времени (qPCR) в присутствии SYBR Green с использованием следующих пар праймеров: специфичные к трансгену пары праймеров точка 1 (5'-CCGACCACTACCAG-CAGAAC-3' и 5'-GTCCATGCCGAGAGTGATCC-3'), точка 2 (5'-AGCTCCTCGCCCTTGCTCAC-CAT-3' и 5'-CCATAATGGCTGCGCCGTAAAG-3'), точка 3 (5'-GCCACTACGACGCTGAGGTCAA-3' и 5'-CGTTGTGGGAGGTGATGTCC-3'). В каче-

стве отрицательного контроля использовалась пара к кодирующей области гена *Ras64B* (5'-GAGGGATTCTGCTCGTCTTCG-3' и 5'-GTC-GCACTTGTACCCACCATC-3'). В качестве положительного контроля использовались пары к области 62D (область высокого обогащения белка Su(Hw), 5'-GAGGGATTCTGCTCGTCTTCG-3' и 5'-GTCGCACTTGTACCCACCATC-3') и к области, соседствующей с *bxdPRE* в геноме, но не входящей в состав трансгена (участок высокого обогащения PcG/TrxG-факторов, 5'-AAGAG-CAAGGCGAAAGAGAGC-3' и 5'-CGTTTAA-AGTGCGACTGAGATGG-3').

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для интеграции трансгенной конструкции, содержащей сайты связывания архитектурного белка Su(Hw), *bxdPRE* и гена *white*, была выбрана область 96E (рис. 1). Согласно ранее полученным нами данным [16], в этой области трансгенный *bxdPRE* в отсутствие сайтов связывания архитектурных белков (Su(Hw), CTCF либо Pita) находится в нейтральном статусе — не репрессирует транскрипцию и не связывает белки групп PcG и TrxG. В то же время в присутствии сайтов связывания для архитектурных белков Su(Hw), CTCF либо Pita происходила индукция репрессии трансгенного гена *white*, которая усиливалась в гомозиготе (эффект PSS). Сайты связывания архитектурных белков обладают инсуляторной активностью — в частности, способностью блокировать PRE-опосредованную репрессию гена мишени. Поэтому в данной системе PRE находится между сайтами связывания архитектурных белков и промотором гена *white*. В таком положении PRE не блокируется сайтами связывания архитектурных белков и способен репрессировать ген *white*.

Фенотипический анализ трансгенной линии HR-Su-bxd и ее производной HR-bxd с делецией сайтов Su(Hw) (см. Материалы и методы) проводился в сравнении с ранее полученными трансгенами Su-bxd и bxd ([16] и рис. 2). В результате было показано, что фенотипы линий HR-Su-bxd и HR-bxd полностью совпадают с фенотипами линий Su-bxd и bxd соответственно. В отсутствие сайтов связывания для архитектурного белка Su(Hw), окраска глаз в геми- и гомозиготе красная, что свидетельствует о неспособности *bxdPRE* репрессировать маркерный ген *white*. В то же время, в присутствии сайтов Su(Hw), окраска глаз гораздо светлее как у гемизигот (коричневый), так и у гомозигот (светло-желтый). Это свидетельствует о репрессии гена *white*. Более сильная репрессия в гомозиготном состоянии согласуется с эффектом PSS, характерным для PRE-элементов. Таким образом, сайты связывания для архитектурного белка Su(Hw) индуцируют репрессию, опосредованную сайленсером *bxdPRE*. Кроме того, для индук-

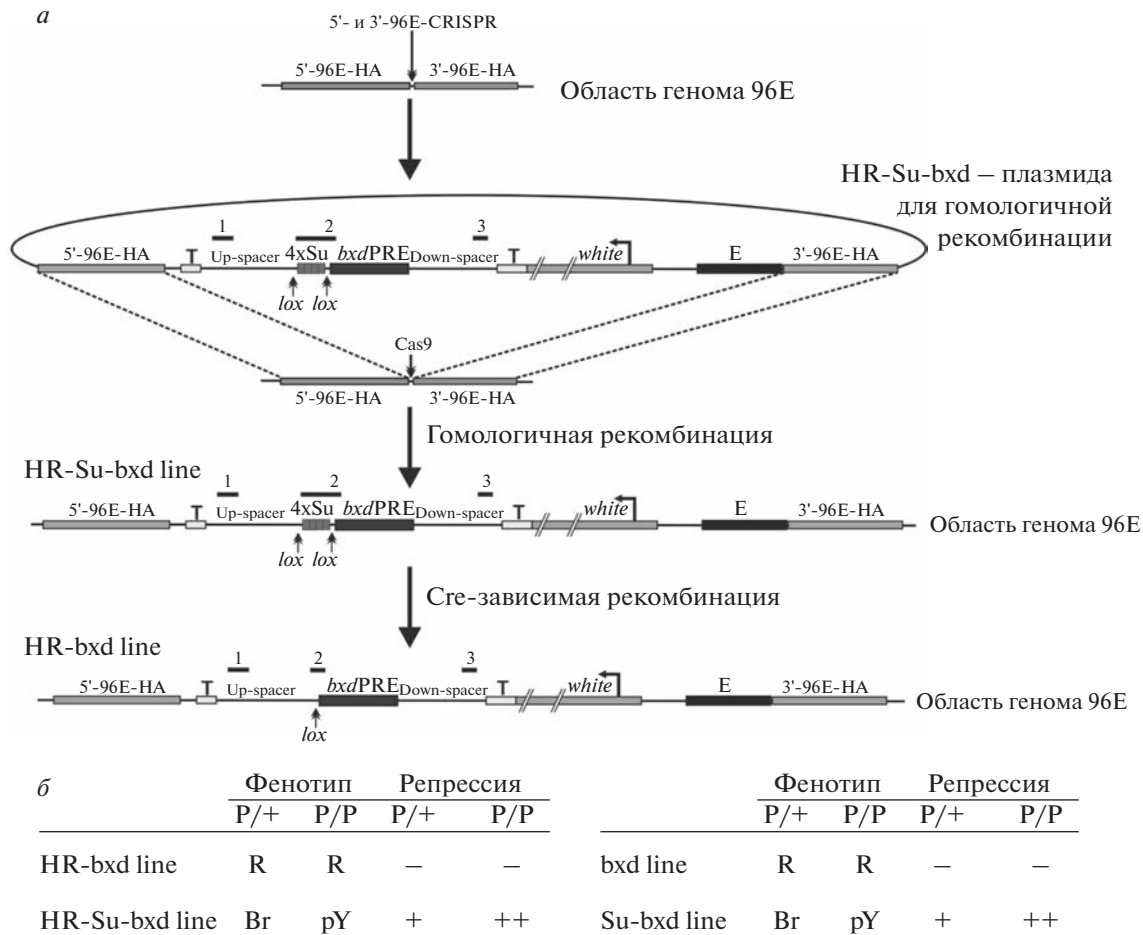


Рис. 2. Сайты связывания для архитектурного белка Su(Hw) индуцируют репрессивную активность *bxdPRE* вне зависимости от использованной системы интеграции трансгена. *a* — общая схема интеграции конструкции HR-Su-bxd в область 96E с использованием системы CRISPR/Cas9. Последующая Cre-зависимая рекомбинация приводит к удалению сайтов связывания белка Su(Hw) (4xSu) и получению производной линии HR-bxd. *b* — фенотипы мух трансгенных линий HR-bxd, HR-Su-bxd, Su-bxd, bxd. В конструкциях HR-bxd и bxd, в отсутствие сайтов связывания для Su(Hw) рядом с *bxdPRE*, окраска глаз в геми- (P/+) и гомозиготе (P/P) R — красная, что свидетельствует об отсутствии (—) репрессии. В конструкциях HR-Su-bxd и Su-bxd, в присутствии 4xSu рядом с *bxdPRE*, окраска глаз в геми- (P/+, Br — коричневая) и гомозиготе (P/P, pY — светло-желтая), что свидетельствует о репрессии в гемизиготе (+), усиливающейся в гомозиготе (++)).

ции активности PRE сайтами Su(Hw) не требуется наличия присутствующих после PhiC31-зависимой интеграции конструкции в геноме элементов, так как при CRISPR/Cas9-зависимой inserции происходит встраивание только внутренних элементов конструкции.

На следующем этапе методом X-ChIP с последующей количественной ПЦР (qPCR) мы проверили состав белковых комплексов, рекрутирующихся на элемент *bxdPRE* в присутствии и в отсутствие сайтов связывания для белка Su(Hw). Сначала мы протестировали связывание белка Su(Hw) (рис. 3,а). В полном соответствии с ожиданиями Su(Hw) связывается со своими сайтами в созданной трансгенной конструкции. При этом делеция сайтов связывания для Su(Hw) приводит к потере его ассоциации в области трансгена с *bxdPRE*.

Далее было исследовано связывание репрессоров группы Polycomb — факторов Ph (субъединица комплекса PRC1) и Sfnbt (субъединица комплекса PhoRC). В результате X-ChIP-анализа было установлено, что данные факторы активно рекрутируются на область *bxdPRE* в составе трансгена только в случае наличия рядом расположенных сайтов связывания для Su(Hw) (рис. 3,б, в). Этот факт полностью согласуется с полученными фенотипическими данными по уровню экспрессии гена *white*. Важно, что PRE-ассоциированный ДНК-связывающий фактор Combgar [27] также рекрутируется на трансген-расположенный *bxdPRE* только в присутствие сайтов Su(Hw) (рис. 3,г). В полном соответствии с полученными нами ранее данными, стимуляция PRE-зависимой репрессии сайтами связывания Su(Hw) связана не толь-

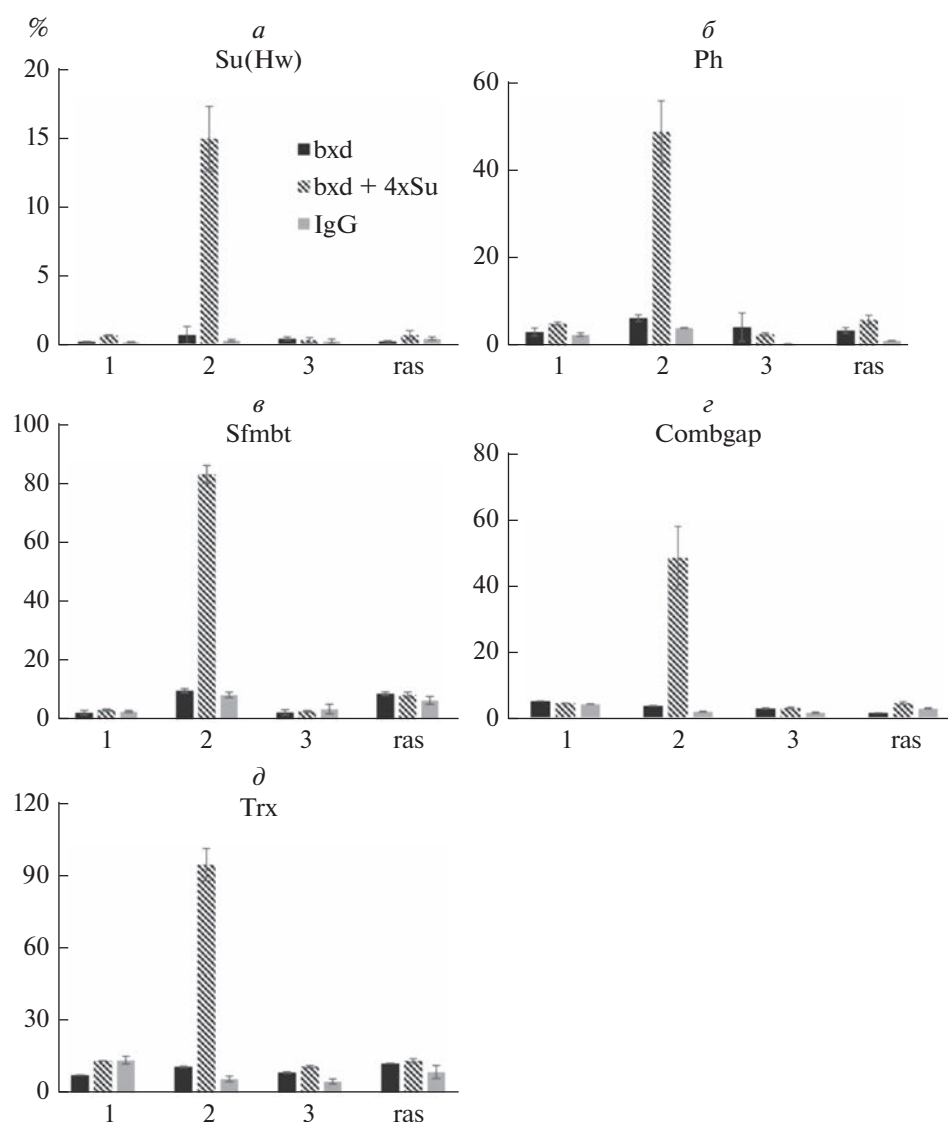


Рис. 3. Рекрутирование белков PcG/TrxG на *bxd*PRE в полученных трансгенах зависит от сайтов связывания для архитектурного белка Su(Hw). Результаты X-ChIP-анализа с использованием антител к белкам Su(Hw) (а), Ph (б), Sfmbl (в), Combgap (г), Trx (д). Цифры на оси абсцисс 1, 2, 3 обозначают ампликоны, использованные в количественной ПЦР (qPCR) и указаны на схеме конструкций на рис. 2 соответствующими цифрами. Ось ординат – обогащения при иммунопреципитации хроматина показаны в виде доли от исходного образца (Input) с нормировкой на эндогенный позитивный контроль – область эффективного связывания Su(Hw) 62D (а) или рядом с *bxd*PRE в геноме (б–д). Кодированная область гена Ras64В использовалась как отрицательный контроль (ras). На диаграммах черные столбцы обозначают обогащение для линии HR-*bxd*, заштрихованные столбцы – для линии HR-Su-*bxd*, серые столбцы – обогащение, полученное при использовании неспецифических антител (IgG). Вертикальными отрезками указаны стандартные отклонения.

ко с привлечением репрессоров группы PcG, но также и белков семейства TrxG, в частности, белка Trithorax (рис. 3,д).

Таким образом, архитектурный белок Su(Hw) вне зависимости от системы интеграции способен стимулировать рекрутирование эпигенетических регуляторов PcG/TrxG на хроматин и переводить PRE-элемент из неактивного в активное состояние.

ОБСУЖДЕНИЕ

Белки PcG/TrxG являются ключевыми транскрипционными регуляторами, однако вопрос об их специфичном привлечении в строго определенные места генома остается открытым. В данных процессах большую роль, по крайней мере у *Drosophila*, отводят PRE-ДНК-связывающим факторам, которые взаимодействуют с белками PcG/TrxG и направленно рекрутируют данные

комплексы на соответствующие хроматиновые мишени. Однако детали данных процессов не известны. Недавно нами было показано, что расположенные рядом с PRE-сайты связывания архитектурных белков Su(Hw), CTCF или Pita способны стимулировать, а в отдельных случаях и инициировать, привлечение PcG/TrxG факторов и, как следствие, усиливать или индуцировать Polycomb-зависимую репрессию гена-мишени. В качестве объяснения наблюдаемого феномена можно выдвинуть две гипотезы. Согласно первой, связывание архитектурных белков локально дестабилизирует взаимодействие нуклеосом с хроматином, что делает сайты связывания для PcG/TrxG-ассоциированных ДНК-связывающих белков более доступными. Согласно второй гипотезе, архитектурные белки способны создавать и поддерживать стабильные пространственные взаимодействия в ядре [28, 29], что способствует взаимодействию между PRE-элементами и, как следствие, приводит к усилению репрессии. Ранее нами была использована система интеграции PhiC31, в которой для встройки конструкции в геном использовались дополнительные ДНК-регуляторные элементы, потенциально способные так же, как и сайты связывания для архитектурных белков, оказывать влияние на рекрутирование PcG/TrxG факторов на PRE. В представленном исследовании мы протестировали возможную роль таких дополнительных последовательностей в стимуляции активности PRE-элемента. Для этого мы осуществили встройку трансгенной конструкции, содержащей все функциональные элементы ранее использованного вектора, в то же самое место генома (область 96E), но с применением технологии CRISPR/Cas9. В результате было установлено, что сайты связывания для архитектурного белка Su(Hw) вне зависимости от используемой системы интеграции способствуют привлечению как канонических комплексов PcG (PRC1, PhoRC), так и белка Trx из группы TrxG. Важно отметить, что привлечение ДНК-связывающего фактора Combgar также наблюдалось только в присутствии сайтов Su(Hw). Полученные результаты подтверждают, что в рекрутировании белков групп PcG/TrxG на хроматин важную регуляторную роль могут играть архитектурные факторы, такие как белок Su(Hw) у *Drosophila*.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-74-10099. В работе была использована инфраструктура Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ИБГ РАН.

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. Chetverina D.A., Elizav'ev P.V., Lomaev D.V. et al. Control of the gene activity by Polycomb and Trithorax group proteins in *Drosophila* // Russian J. Genetics. 2017. V. 53. № 2. P. 133–154.
2. Kassis J.A., Kennison J.A., Tamkun J.W. Polycomb and Trithorax group genes in *Drosophila* // Genetics. 2017. V. 206. № 4. P. 1699–1725. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.185116>
3. Schuettengruber B., Bourbon H.M., Di Croce L., Cavalli G. Genome regulation by Polycomb and Trithorax: 70 years and counting // Cell. 2017. V. 171. № 1. P. 34–57. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.002>
4. Chetverina D.A., Lomaev D.V., Erokhin M.M. Polycomb and Trithorax group proteins: The long road from mutations in *Drosophila* to use in medicine // Acta Naturae. 2020. V. 12. № 4. P. 66–85. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11090>
5. Четверина Д.А., Ломаев Д.В., Георгиев П.Г., Ерохин М.М. Генетические нарушения активности PRC2 при онкологии: проблемы и перспективы // Генетика. 2021. Т. 57. № 3. С. 235–289. <https://doi.org/10.31857/S0016675821030048>
6. Erokhin M., Chetverina O., Györfy B. et al. Clinical correlations of Polycomb repressive complex 2 in different tumor types // Cancers (Basel). 2021. V. 13. № 13. <https://doi.org/10.3390/cancers1313155>
7. Piunti A., Shilatifard A. The roles of Polycomb repressive complexes in mammalian development and cancer // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2021. V. 22. № 5. P. 326–345. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00341-1>
8. Parreno V., Martinez A.M., Cavalli G. Mechanisms of Polycomb group protein function in cancer // Cell Res. 2022. V. 32. № 3. P. 231–253. <https://doi.org/10.1038/s41422-021-00606-6>
9. Erokhin M., Georgiev P., Chetverina D. *Drosophila* DNA-binding proteins in Polycomb repression // Epigenomes. 2018. V. 2. № 1. P. 1. <https://doi.org/10.3390/epigenomes2010001>
10. Kuroda M.I., Kang H., De S., Kassis J.A. Dynamic competition of Polycomb and Trithorax in transcriptional programming // Annu. Rev. Biochem. 2020. V. 89. P. 235–253. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-120219-103641>
11. Kassis J.A. Unusual properties of regulatory DNA from the *Drosophila* engrailed gene: Three “pairing-sensitive” sites within a 1.6-kb region // Genetics. 1994. V. 136. № 3. P. 1025–1038. <https://doi.org/10.1093/genetics/136.3.1025>
12. Kassis J.A. Pairing-sensitive silencing, polycomb group response elements, and transposon homing in *Drosophila* // Adv. Genet. 2002. V. 46. P. 421–438. [https://doi.org/10.1016/s0065-2660\(02\)46015-4](https://doi.org/10.1016/s0065-2660(02)46015-4)
13. Mihaly J., Hogga I., Gausz J. et al. In situ dissection of the Fab-7 region of the bithorax complex into a chromatin domain boundary and a Polycomb-response element // Development. 1997. V. 124. № 9. P. 1809–1820. <https://doi.org/10.1242/dev.124.9.1809>
14. De S., Cheng Y., Sun M.A. et al. Structure and function of an ectopic Polycomb chromatin domain // Sci. Adv. 2019. V. 5. № 1. P. eaau9739. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau9739>
15. De S., Mitra A., Cheng Y. et al. Formation of a Polycomb-domain in the absence of strong Polycomb response ele-

- ments // PLoS Genet. 2016. V. 12. № 7. P. e1006200. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006200>
16. Erokhin M., Gorbenko F., Lomaev D. et al. Boundaries potentiate Polycomb response element-mediated silencing // BMC Biol. 2021. V. 19. № 1. P. 113. <https://doi.org/10.1186/s12915-021-01047-8>
 17. Horard B., Tatout C., Poux S., Pirrotta V. Structure of a Polycomb response element and *in vitro* binding of Polycomb group complexes containing GAGA factor // Mol. Cell. Biol. 2000. V. 20. № 9. P. 3187–3197. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.9.3187-3197.2000>
 18. Bischof J., Maeda R.K., Hediger M. et al. An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. № 9. P. 3312–3317. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611511104>
 19. Port F., Chen H.M., Lee T., Bullock S.L. Optimized CRISPR/Cas tools for efficient germline and somatic genome engineering in *Drosophila* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2014. V. 111. № 29. P. E2967–2976. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405500111>
 20. Gratz S.J., Ukken F.P., Rubinstein C.D. et al. Highly specific and efficient CRISPR/Cas9-catalyzed homology-directed repair in *Drosophila* // Genetics. 2014. V. 196. № 4. P. 961–971. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.160713>
 21. Zolotarev N., Maksimenko O., Kyrchanova O. et al. Opbp is a new architectural/insulator protein required for ribosomal gene expression // Nucl. Ac. Res. 2017. V. 45. № 21. P. 12285–12300. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx840>
 22. Erokhin M., Davydova A., Kyrchanova O. et al. Insulators form gene loops by interacting with promoters in *Drosophila* // Development. 2011. V. 138. № 18. P. 4097–4106. <https://doi.org/10.1242/dev.062836>
 23. Siegal M.L., Hartl D.L. Application of Cre/loxP in *Drosophila*. Site-specific recombination and transgene co-placement // Methods Mol. Biol. 2000. V. 136. P. 487–495. <https://doi.org/10.1385/1-59259-065-9:487>
 24. Melnikova L., Elizhar'ev P., Erokhin M. et al. The same domain of Su(Hw) is required for enhancer blocking and direct promoter repression // Sci. Rep. 2019. V. 9. № 1. P. 5314. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41761-6>
 25. Erokhin M., Davydova A., Parshikov A. et al. Transcription through enhancers suppresses their activity in *Drosophila* // Epigenetics Chromatin. 2013. V. 6. № 1. P. 31. <https://doi.org/10.1186/1756-8935-6-31>
 26. Erokhin M., Elizhar'ev P., Parshikov A. et al. Transcriptional read-through is not sufficient to induce an epigenetic switch in the silencing activity of Polycomb response elements // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2015. V. 112. № 48. P. 14930–14935. <https://doi.org/10.1073/pnas.1515276112>
 27. Ray P., De S., Mitra A. et al. Combgap contributes to recruitment of Polycomb group proteins in *Drosophila* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2016. V. 113. № 14. P. 3826–3831. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520926113>
 28. Chetverina D., Aoki T., Erokhin M. et al. Making connections: Insulators organize eukaryotic chromosomes into independent cis-regulatory networks // Bioessays. 2014. V. 36. № 2. P. 163–172. <https://doi.org/10.1002/bies.201300125>
 29. Chetverina D., Fujioka M., Erokhin M. et al. Boundaries of loop domains (insulators): Determinants of chromosome form and function in multicellular eukaryotes // Bioessays. 2017. V. 39. № 3. <https://doi.org/10.1002/bies.201600233>

Su(Hw) Architectural Protein Binding Sites Stimulate Recruitment of PcG/TrxG Epigenetic Regulators to Chromatin: CRISPR/Cas9-Test

M. M. Erokhin^{a, *}, F. V. Gorbenko^a, D. V. Lomaev^a, and D. A. Chetverina^{a, **}

^a*Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia*

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

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

Polycomb and Trithorax group proteins (PcG and TrxG) are epigenetic factors responsible for the repression and activation of transcription, respectively. In *Drosophila*, PcG/TrxG proteins are recruited to specialized DNA elements called PRE (Polycomb response elements). Depending on the context, these elements may repress, activate, or be neutral with respect to the promoter of the target gene. Previously, in transgenic studies using PhiC31 site-specific integration system, we have demonstrated that sites for architectural proteins inserted next to PRE can induce the repressive activity of *bxd*PRE by stimulating the binding of PcG/TrxG factors to this element. However, this effect may depend on additional DNA elements present at the integration site after PhiC31-dependent transgene insertion. In the present study, using an alternative system of integration based on CRISPR/Cas9-catalyzed homology-directed repair, we have proved that the binding sites of the architectural protein Su(Hw) are indeed able to induce the repressive activity of *bxd*PRE and recruitment of PcG/TrxG proteins, regardless the heterogenous DNA-sequences present at the site of integration after PhiC31-dependent insertion of the transgenes.

Keywords: *Drosophila*, Polycomb, PRE-element, repression of transcription.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МОЖЖЕВЕЛЬНИКА ОБЫКНОВЕННОГО (*Juniperus communis* L.) В ЕВРАЗИИ И НА АЛЯСКЕ ПО ДАННЫМ АНАЛИЗА ЯДЕРНЫХ МИКРОСАТЕЛЛИТОВ

© 2023 г. Е. В. Хантемирова¹, *, В. А. Бессонова¹

¹Институт экологии растений и животных Уральского отделения
Российской академии наук, Екатеринбург, 620144 Россия

*e-mail: hantemirova@ipae.uran.ru

Поступила в редакцию 25.04.2022 г.

После доработки 16.09.2022 г.

Принята к публикации 27.09.2022 г.

Изучена структура генетической изменчивости можжевельника обыкновенного (*Juniperus communis* L.), широко распространенного голарктического ветроопыляемого кустарника семейства Cupressaceae. Для генотипирования выборок из 23 популяций этого вида со всего ареала в Евразии и одной популяции из Северной Америки (Аляска) использовали семь ядерных микросателлитных локусов, три из которых были применены для данного вида впервые. Географические закономерности распределения генетической изменчивости интерпретируются в сравнении с нашими предыдущими данными по изменчивости хпДНК. Получены такие же высокие значения генетического разнообразия, с максимальными показателями в северных популяциях (Швеция, Эстония, Мезень, Полярный Урал, Ямал, Колыма, а также Альпы), но более низкий уровень межпопуляционной дифференциации ($F_{ST} = 9.8\%$ для ядерных маркеров, $F_{ST} = 76\%$ для хлоропластных). С помощью байесовского кластерного анализа было установлено, что оптимальное число генетических групп (K) равно двум. Все 24 популяции *J. communis* делятся на восточную группу (северо-восток и Дальний Восток России, Аляска и Гималаи) и западную группу (Европа, Урал и Сибирь). Для популяций из Альп и Горной Шории характерно сочетание генотипов из разных генетических групп.

Ключевые слова: *J. communis*, ядерные микросателлиты, SSR-маркеры, генетическое разнообразие.

DOI: 10.31857/S0016675823030050, **EDN:** INZGJC

Холодостойкие кустарниковые виды растений играли важную роль в фитоценозах в прошлые геологические эпохи Земли, да и теперь имеют огромное значение в сложении растительного покрова северных и горных территорий, укреплении, обогащении почв и создании условий для будущих стадий сукцессий при возможных изменениях климата. При этом исследований их филогеографии и генетической изменчивости проведено гораздо меньше, чем для лесобразующих видов деревьев.

Известно, что на распределение генетической изменчивости внутри видов растений значительно влияли плейстоценовые колебания климата [1, 2]. В период похолодания некоторые адаптированные к холоду виды деревьев и кустарников Северного полушария не ограничивались южными ледниковыми рефугиумами, а сохраняли довольно обширные популяции вблизи ледниковых щитов [3]. Эти популяции расширяли свои ареалы во время теплых стадий и обладали значительным потоком генов [4].

Одним из таких видов, которые могли выживать во время холодных эпизодов плейстоцена в высоких широтах в Северной Европе во многих перигляциальных микрорефугиумах, является можжевельник обыкновенный *Juniperus communis* L. Этот холодостойкий бореально-арктический хвойный кустарниковый вид из семейства Cupressaceae занимает обширный ареал благодаря широкой экологической толерантности, морфологической пластичности и эффективному способу распространения семян. Основная часть его ареала находится на территории России, которая обладает значительными, еще недостаточно изученными биологическими ресурсами этого ценного вида (рис. 1). Целебные свойства этого вечнозеленого кустарника были известны в древности. В настоящее время в его растительном сырье обнаружено большое количество терпенов, полифенолов и их производных, доказана его антиоксидантная, противомикробная, противовоспалительная, противо-раковая, нейропротекторная и гепатопротекторная активность и отмечен огромный потенциал

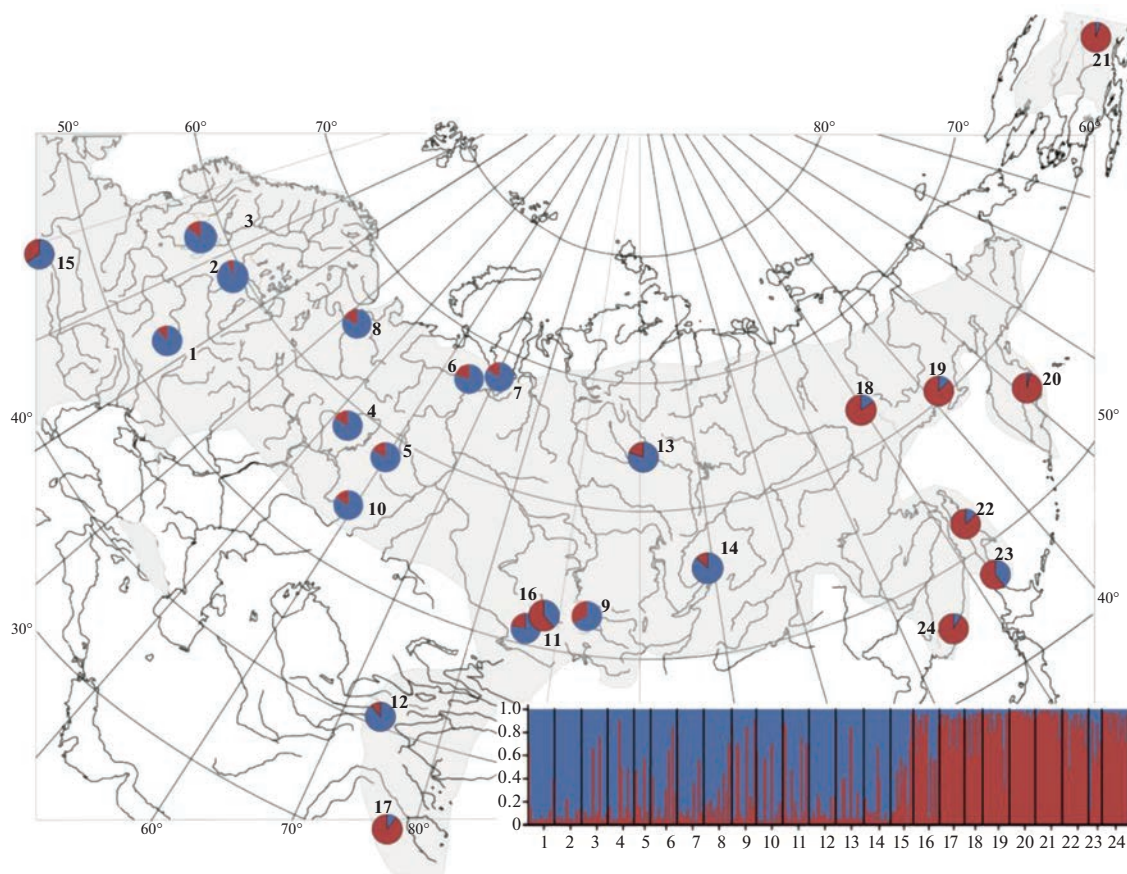


Рис. 1. Географическое распределение главных генетических групп *J. communis* по результатам анализа STRUCTURE. Номера популяций такие же, как в табл. 1. Каждая популяция разделена на два цветных сегмента пропорционально ее принадлежности к данной группе. Серым цветом выделен ареал вида.

применения этого вида в различных областях медицины [5].

Широкое географическое распространение *J. communis* L. при большом экологическом диапазоне вызвало образование разнообразных жизненных форм (от стлаников до деревьев). С полиморфизмом этого вида связаны и трудности во внутривидовой таксономической классификации. На территории Евразии прямостоячую форму этого вида, свойственную подлеску хвойных и лиственных лесов, принято относить к *J. communis* var. *communis* L., а кустовидную форму разной степени полегания — к *J. communis* var. *saxatilis* Pall. (= *J. sibirica* Burgsd., *J. nana* Willd., *J. alpina* S.F. Gray, *J. pygmaea* K. Koch., *J. montana* (Aiton) Lindl. & Gordon) [6]. Обе разновидности имеют сходные морфологические признаки и перекрывающийся ареал. На территории Северной Америки выделяют еще одну разновидность *J. communis* var. *depressa* Pursh. Из-за отсутствия четких разграничивающих признаков у этих разновидностей мы рассматриваем здесь *J. communis* sensu lato, т.е. в широком смысле.

Генетические исследования *J. communis* с помощью разных методов проводились большей ча-

стью в популяциях на территории Европы, где этот вид значительно сократил численность и подвергся антропогенной фрагментации [7, 8]. При этом во всех популяциях этого вида в Дании [9], Польше [10], в Ирландии [11] и Англии [12] был обнаружен высокий уровень генетической изменчивости, причем нередко даже внутри небольших фрагментарных популяций. С помощью анализа AFLP было показано, что даже маленькие реликтовые популяции *J. communis* на юге Англии (некоторые из них насчитывают около 11 растений) обладают высоким уровнем генетической изменчивости [12]. Высокий уровень межпопуляционной дифференциации, обнаруженный в этой же работе, авторы связывают с заселением острова можжевельником из трех разных источников, с последующей изоляцией и уменьшением размера популяций. Во всех других работах была выявлена низкая степень дифференциации, что свидетельствует о значительном геномном потоке. Низкая генетическая дифференциация и высокое внутривидовое разнообразие характерны для многих голосеменных растений и связаны с такими чертами их жизненного цикла как дву-

домность, ауткроссинг, ветроопыление, долгая продолжительность жизни [13].

Польскими исследователями [14] для этого вида были разработаны высокоизменчивые ядерные микросателлитные маркеры. Они были применены для изучения генетической изменчивости в редуцированных фрагментарных популяциях можжевельника на территории Европы, в Германии [15] и Бельгии [16]. С помощью этих маркеров в большинстве популяций также обнаружены высокое внутрипопуляционное генетическое разнообразие и низкая степень межпопуляционной дифференциации. В целом ядерные микросателлиты не выявили в европейских популяциях можжевельника какой-либо филогеографической структуры. В то же время в этих популяциях обнаружены высокие положительные значения коэффициента инбридинга. Связано ли это с наличием нуль-аллелей в большинстве локусов или с какими-то другими факторами — осталось непонятно.

Исследование внутривидовой изменчивости растений разными методами имеет большое теоретическое и практическое значение для решения проблем происхождения и эволюции видов, оценки их генетических ресурсов и эволюционного потенциала, а также для разработки правильных мер по охране и рациональному использованию видов.

В предыдущей работе мы изучили генетическую изменчивость этого вида с помощью хлоропластных маркеров в широком географическом контексте в природных ненарушенных популяциях в Евразии и частично в Северной Америке и выявили дифференциацию дальневосточных и центрально-азиатских популяций. Распределение генетической изменчивости по всему ареалу позволило нам выдвинуть некоторые гипотезы относительно плейстоценовой динамики вида [17]. В настоящей работе те же выборки можжевельника обыкновенного со всего ареала мы анализируем с помощью ядерных микросателлитов (SSR-маркеров).

Для этого мы используем высокоизменчивые микросателлитные локусы, разработанные польскими исследователями [14], дополнив их новыми, разработанными для других видов можжевельников и протестированными нами на *J. communis*.

В настоящей работе мы ставим своей целью оценить географические закономерности распределения генетического разнообразия и степень дифференциации популяций можжевельника обыкновенного на всем ареале в Евразии и частично в Северной Америке (Аляске) с помощью мультилокусного генетического анализа ядерных микросателлитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Мультилокусный генетический анализ с помощью ядерных микросателлитов был проведен на образцах ДНК *J. communis* из большей части тех же популяций, что и в исследовании хпДНК [17]. Изучены 24 популяции можжевельника (23 популяции в Евразии и одна в Северной Америке, на Аляске) (табл. 1, рис. 1). Всего прогенотипировано 363 образца, примерно по 16 образцов из каждой популяции. Микросателлитные локусы *Jc16*, *Jc031*, *Jc032*, *Jc035*, *Jc037*, разработанные для этого вида [14], были протестированы на нескольких образцах. Локус *Jc037* исключен из-за нестабильной амплификации и трудности с интерпретацией аллелей. Кроме того, на *J. communis* были протестированы 9 пар праймеров, разработанных для *J. przewalskii* [18], и 13 пар праймеров — для *J. cedrus* [19] на предмет изменчивости и стабильности амплификации. Для этого на восьми образцах ДНК из двух популяций *J. communis* из разных географических точек проводили ПЦР-амплификацию с немечеными олигонуклеотидами, затем визуализировали продукты реакции на акриламидных гелях с серебряным окрашиванием. Шесть локусов, разработанных для *J. cedrus* (*Jce01*, *Jce09*, *Jce10*, *Jce11*, *Jce12* и *Jce13*), оказались изменчивы также и для *J. communis*. Из них были отобраны три локуса *Jce01*, *Jce10* и *Jce13*, которые лучше всего амплифицировались. В итоге отобрано семь локусов, из которых был составлен мультиплекс с учетом температуры отжига праймеров, сочетания флуоресцентного красителя и длины продукта (табл. 2). Использовалась следующая программа ПЦР: 5 мин при 95°C, затем 35 циклов: 30 с при 95°C, 90 с при 57°C или 61°C, 90 с при 72°C и 30 мин при 72°C. Для локуса *Jc032* использовали протокол с понижением температуры отжига [14]. ПЦР-продукт разводили в 5 раз. 1 мкл разбавленного ПЦР-продукта смешивали с 8.5 мкл формамида и 0.5 мкл размерного стандарта или маркера молекулярной массы S-450 (Гордиз). Длины амплифицированных фрагментов определяли на НАНОФОР-05. Хроматограммы расшифровывались в программе GeneMapper v4.0 сначала автоматически, а затем проверялись вручную.

С помощью программ GenAlex v6.5 и Arlequin v3.5.2 вычисляли следующие параметры генетической изменчивости: среднее число аллелей на локус (N_a), число уникальных аллелей, процент полиморфных локусов (%P), индекс Шеннона (I), наблюдаемая (H_o) и ожидаемая (H_e) гетерозиготность, индекс фиксации (F), коэффициент генетической дифференциации среди популяций (F_{ST}). Тест на равновесие Харди–Вайнберга (HWE) был выполнен с помощью GENEPOP v4.2 [20]. Частоту нулевых аллелей оценивали с помощью метода Брукфилда [21], реализованного в программном обеспечении MICRO-CHECKER 2.2.3 [22].

Таблица 1. Показатели генетического разнообразия в 24 популяциях *J. communis*

№	Местонахождение	Широта/долгота	Высота над ур. моря, м	<i>N</i>	<i>N_a</i>	<i>I</i>	<i>H_O</i>	<i>H_E</i>	<i>F</i>
1	Беларусь	N 54°46'/E 26°49'	170	16	7.14	1.56	0.453	0.737	0.319
2	Таллинн	N 57°27'/E 24°52'	22	16	8.43	1.73	0.480	0.779	0.388
3	Упсала	N 59°53'/E 17°36'	21	16	8.43	1.67	0.507	0.756	0.310
4	Удмуртия	N 57°31'/E 52°32'	150	16	7.57	1.58	0.472	0.708	0.270
5	Полевской	N 56°25'/E 60°11'	403	10	5.88	1.45	0.440	0.723	0.307
6	Полярный Урал	N 66°51'/E 65°20'	547	16	8.27	1.76	0.534	0.796	0.313
7	П-ов Ямал	N 67°11'/E 71°15'	3	16	8.71	1.80	0.532	0.807	0.337
8	Мезень	N 65°18'/E 43°56'	22	17	8.86	1.75	0.423	0.760	0.467
9	Ергаки	N 53°08'/E 92°56'	1750	15	6.0	1.44	0.332	0.710	0.523
10	Зюраткуль, Южный Урал	N 54°56'/E 59°11'	943	16	7.14	1.54	0.606	0.716	0.114
11	Алтай, Телецкое оз.	N 51°46'/E 87°17'	790	16	6.14	1.39	0.428	0.691	0.311
12	Тянь-Шань, Киргизия	N 42°35'/E 74°29'	2000	16	5.57	1.26	0.440	0.628	0.306
13	Тура	N 64°17'/E 100°17'	353	17	6.57	1.51	0.316	0.730	0.563
14	Северо-Байкальск	N 55°42'/E 109°04'	536	16	5.71	1.32	0.414	0.640	0.322
15	Альпы	N 46°30'/E 14°45'	1759	14	8.71	1.75	0.519	0.790	0.319
16	Горная Шория	N 52°55'/E 88°00'	1570	16	5.14	1.33	0.459	0.693	0.314
17	Гималаи	N 31°06'/E 77°10'	3300	15	4.29	1.01	0.332	0.537	0.324
18	Колыма	N 63°26'/E 140°38'	1025	11	7.14	1.68	0.560	0.794	0.294
19	Магадан	N 59°34'/E 151° 7'	30	16	6.57	1.50	0.360	0.724	0.480
20	Камчатка	N 56°01'/E 161°11'	50	16	5.00	1.16	0.328	0.600	0.419
21	Аляска, Сев. Америка	N 64°50'/E 147°40'	135	16	4.43	0.98	0.369	0.523	0.286
22	Палево, центр. часть о-ва Сахалин	N 50°34'/E 142°42'	189	16	6.57	1.52	0.341	0.751	0.523
23	Невельск, юж. часть о-ва Сахалин	N 46°40'/E 141°51'	6	8	5.86	1.48	0.551	0.751	0.195
24	Сихоте-Алинь	N 45°48'/E 136°36'	1392	16	6.7	1.37	0.387	0.676	0.471
Среднее					6.69	1.48	0.440	0.708	0.355

Примечание. *N* – общее количество образцов, *N_a* – среднее число аллелей на локус, *I* – индекс Шеннона, *H_O* – наблюдаемая гетерозиготность, *H_E* – ожидаемая гетерозиготность, *F* – коэффициент инбридинга.

С помощью пакета программ Arlequin v3.5.1.2 [23] определяли уровень дифференциации и распределение генетической изменчивости между группами гаплотипов (анализ молекулярной вариации, AMOVA). Значение *F_{ST}* было получено для измерения молекулярной дивергенции между популяциями и группами популяций.

Несколько подходов были использованы для изучения популяционной структуры и филогенетического анализа можжевельника обыкновенного. Сначала с помощью анализа главных координат в GENALEX 6.5 была проведена кластеризация популяций на основе матрицы парных генетических дистанций (DA) [24]. Затем оценивался

вклад генотипов в каждую изучаемую популяцию на основе байесовского подхода с алгоритмом MCMC (цепь Маркова Монте-Карло) с помощью STRUCTURE 2.3.4 [25]. Наиболее вероятное количество кластеров оценивалось на основе апостериорной вероятности данных для заданного *K* и проводилось с помощью STRUCTURE HARVESTER методом Evanno [26]. Для идентификации популяционных кластеров был также использован пространственный анализ молекулярной изменчивости (SAMOVA v1.0) [27]. Корреляцию между генетическим и географическим расстояниями для пар выборок анализировали посредством теста Мантелла [28].

Таблица 2. Характеристика семи микросателлитных локусов, используемых для *J. communis*

Локус	Мотив	Размер фрагмента, пн*	Ta, °C*	Число аллелей	Размер фрагмента, пн**	Ta, °C**	Литературный источник
<i>Jc035</i> F: FAM	(CA) ₂₀	131–167	50	24	127–172	57	[14]
<i>Jce01</i> F: FAM	(AAACCT) ₆	220–251	61	7	227–269	61	[19]
<i>Jce10</i> F: FAM	(ATC) ₁₀	292–301	61	10	266–293	61	[19]
<i>Jc016</i> F: HEX	(GT) ₂₄	118–154	50	24	118–172	57	[14]
<i>Jc031</i> F: HEX	(CA) ₁₅	174–242	50	32	174–242	57	[14]
<i>Jc032</i> F: ROX	(AC) ₁₄ (ATC) ₈	158–224	50	44	172–242	57	[14]
<i>Jce13</i> F: TAMRA	(CATA) ₁₂	170–200	55	16	174–230	57	[19]

Примечание. * – размер фрагмента и температура аннилинга Ta в оригинальном исследовании, ** – размер фрагмента и температура аннилинга Ta в настоящем исследовании.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При анализе изменчивости семи микросателлитных локусов в 24 популяциях *J. communis* выявлено 157 аллельных вариантов. Большинство локусов были полиморфными во всех выборках. Средний процент полиморфных локусов в популяциях составляет 99.32. Наиболее изменчив ло-

кус *Jc032* (44 варианта аллелей), наименее – *Jce01* (7 вариантов аллелей). Общее число уникальных аллелей составило 35.

В популяциях *J. communis* обнаружено высокое генетическое разнообразие ($H_E = 0.523–0.807$). Причем наиболее высокие значения наблюдаются в северных популяциях – Уппсале, Эстонии,

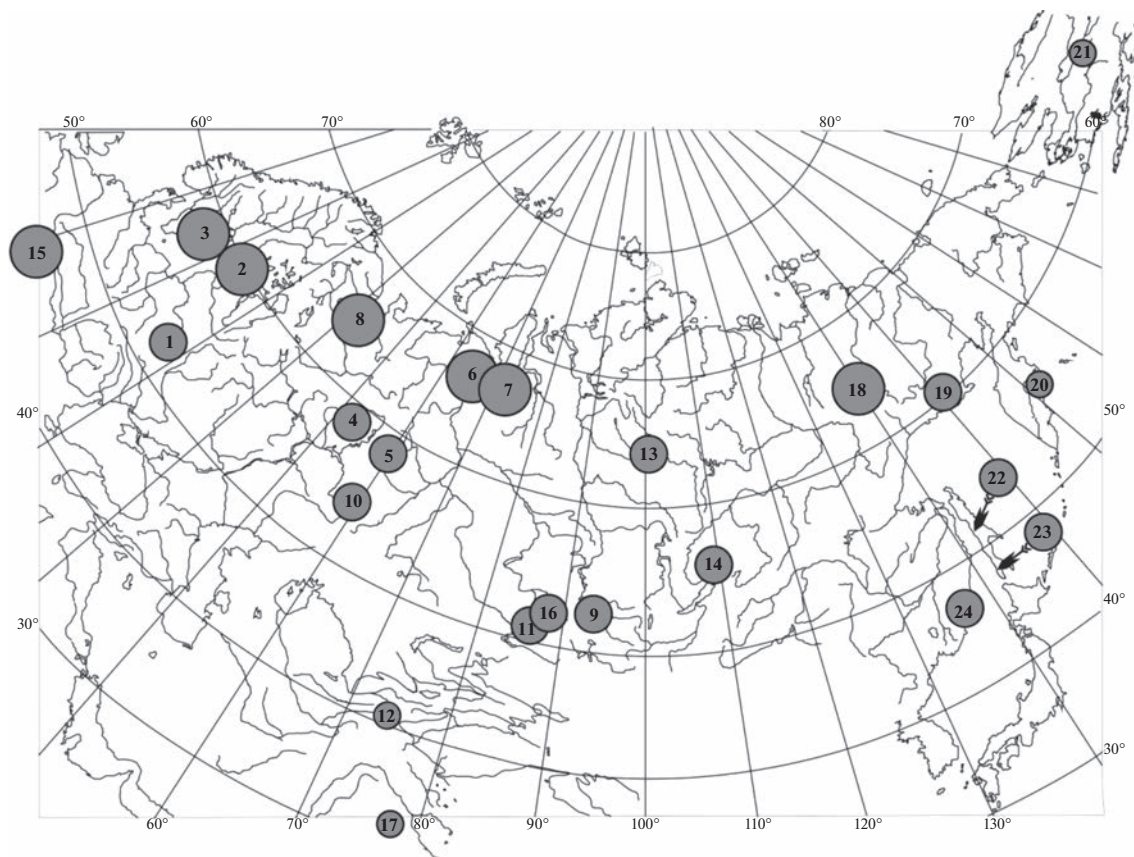


Рис. 2. Показатели генетического разнообразия H_E в 24 популяциях *J. communis* по данным изменчивости SSR-маркеров. Размер окружностей пропорционален уровню изменчивости: минимальный размер соответствует $H_E = 0.52–0.63$, средний – $0.64–0.75$, максимальный – $0.76–0.81$.

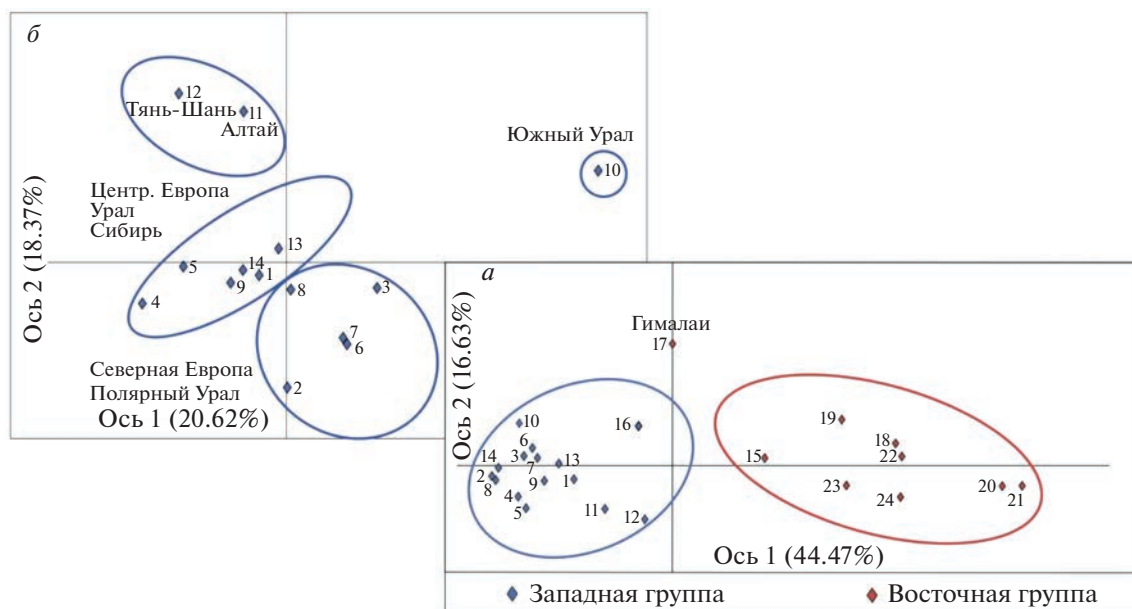


Рис. 3. Ординация популяций *J. communis* методом главных координат (PCoA) на основании генетических дистанций Нея. а — все популяции, б — популяции западной генетической группы.

Мезени, Полярном Урале, Ямале, Колыме, а также в Альпах (табл. 1, рис. 2). В альпийской выборке присутствует также наибольшее число уникальных аллелей (6).

Во всех микросателлитных локусах, кроме *Jc035*, обнаружены нуль-аллели. Во всех популяциях наблюдаются отклонения от Харди–Вайнберга с дефицитом гетерозигот. Значения F высокоположительные, варьирующие от 0.114 до 0.563.

Степень генетической дифференциации между всеми анализируемыми популяциями ($F_{ST} = 9.8\%$) невысока по сравнению с той, что была выявлена при изучении изменчивости хпДНК ($F_{ST} = 76\%$) [17], но примерно соответствует среднему значению, указанному для бипарентально наследуемых маркеров у хвойных видов (11.6%) [1].

Согласно тесту Мантелла генетические расстояния между всеми изученными популяциями *J. communis*, основанные на частотах SSR-маркеров, достоверно коррелировали с географическими расстояниями между выборками ($r = 0.574$, $p = 0.01$). Однако пространственный анализ молекулярной изменчивости (SAMOVA v1.0) дифференцирует от всех остальных только две наиболее географически удаленные популяции — из Гималаев и с Аляски.

Оценка данных STRUCTURE методом Evanno показала, что оптимальное число генетических групп K равно двум, дельта $K = 93.78$. В восточном кластере кроме популяций Дальнего Востока России оказывается также гималайская популяция и популяция с Аляски (рис. 1), в западном — все европейские и урало-сибирские популяции. Две до-

полнительные подгруппы $K = 4$ (21.53) выделяют гималайскую популяцию вместе с популяцией из Горной Шории и Тянь-Шаня.

В результате анализа главных координат, основанного на генетических дистанциях Нея между выборками (рис. 3, а), все популяции разделились по первой главной координате (44.5% от общей изменчивости) на две большие группы: 1 — популяции восточного края ареала в Евразии, а также популяции Аляски и Альп; 2 — все остальные европейско-урало-сибирские популяции. Значительно отделена ото всех популяций с Гималаев. Разделение популяций можжевельника по второй главной координате не такое значительное. Можно только отметить близость популяции Приморья (Сихоте-Алинь) с югом Сахалина (Невельск), популяции Камчатки с Аляской, популяции северо-востока России (Колыма, Магадан) с севером Сахалина (Палево).

Однако если обширную вторую группу, включающую популяции с территории Европы, Урала и Сибири, анализировать отдельно (рис. 3, б), то выявляется некая внутренняя дифференциация. В результате анализа главных координат отделяются популяции Центральной Азии (Тянь-Шань вместе с Алтаем) и Южного Урала (Зюраткуль). Близки между собой популяции Северной Европы (Швеция, Эстония, Мезень), а также популяции с Ямала и Полярного Урала. SAMOVA также выделяет горные популяции Тянь-Шаня и Южного Урала в отдельные группы. Однако дифференциация во всей этой группе слабая ($F_{ST} = 5.6\%$). Нет

Таблица 3. Значения показателей F_{IS} , F_{IT} , F_{ST}

Локус	N	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
<i>Jc016</i>	24	0.496	0.574	0.155
<i>Jc031</i>	32	0.431	0.508	0.134
<i>Jc032</i>	44	0.174	0.284	0.133
<i>Jc035</i>	24	0.084	0.177	0.101
<i>Jce01</i>	7	0.502	0.630	0.256
<i>Jce10</i>	10	0.428	0.491	0.111
<i>Jce13</i>	16	0.495	0.652	0.311
Среднее		0.373 ± 0.065	0.474 ± 0.068	0.172 ± 0.030

Примечание. N — число аллелей, F_{IS} — коэффициент инбридинга особи относительно популяций, F_{IT} — коэффициент инбридинга особи относительно вида, F_{ST} — коэффициент инбридинга популяций относительно вида в целом.

корреляции между генетическими и географическими дистанциями ($r = 0.013$, $p = 0.47$).

В некоторых популяциях (из Альп, Горной Шории и с юга Сахалина) наблюдается смешанный состав особей. Альпийская популяция по генетическим дистанциям Нея ближе всего к популяциям восточного края ареала (рис. 3,а). Однако согласно байесовскому анализу в этой популяции есть и особи, принадлежащие к западной группе, причем в преобладающем количестве (рис. 1). В популяции из Горной Шории преобладает доля особей восточной генетической группы, но есть особи из западной группы.

Основной вклад в дифференциацию всех популяций вносят локусы *Jce01* и *Jce13*, разработанные для *J. cedrus* и которые впервые применены в настоящей работе для *J. communis* (табл. 3). При использовании только маркеров, разработанных для *J. communis* Михальчик с соавт. [14], не было дифференциации даже в пределах всего ареала (за исключением Гималаев), что свидетельствует о малой пригодности этих маркеров для филогеографических исследований, несмотря на их высокую изменчивость.

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, в исследованных популяциях *J. communis* мы наблюдаем высокое внутривидовое разнообразие. Средние показатели сравнимы с теми, что обнаружены в европейских фрагментированных далеко отстоящих друг от друга популяциях в Нидерландах [9], Великобритании [12], Саксонии [15] и Бельгии [16], что может свидетельствовать о происхождении последних от исторически больших и взаимосвязанных популяций [29]. И, вероятно, время, прошедшее с начала фрагментации, было слишком коротким,

чтобы иметь какие-либо демографическо-генетические последствия для такого долгоживущего вида как можжевельник.

В этих европейских популяциях можжевельника обнаружены также высокие положительные значения коэффициентов инбридинга, указывающие на дефицит гетерозигот [9, 15, 16]. Удивительно, что приблизительно такие же значения этого показателя получены и в настоящем исследовании даже в наиболее многочисленных, не испытывающих антропогенного влияния популяциях Ямала и Полярного Урала. Наличие нулевых аллелей влияет на значения коэффициента инбридинга, но не на общую генетическую структуру. Вероятно, какие-то другие факторы вносят свой вклад в наблюдаемую закономерность с коэффициентами инбридинга у *J. communis*. Есть мнение, что это явление характерно для многих видов семейства Cupressaceae [30]. Это также может быть связано с неоднородным пространственным распределением особей (эффект Валунда) [31].

Филогеографическая структура можжевельника обыкновенного, выявленная с помощью SSR-маркеров, в целом совпадает с результатами, полученными нами с помощью хлоропластных маркеров, но с меньшей степенью дифференциации. Фактически все популяции делятся на две большие группы — восточную (Гималаи, Дальний Восток России, Аляска) и европейско-урало-сибирскую.

Именно восточная группа вносит основной вклад в дифференциацию ядерных локусов на всем евразийском ареале. В плейстоценовой истории этой территории, которую еще называют Северной Пацификой, было несколько периодов оледенения, но все они были не покровными, а горно-долинными, поэтому растения могли сохраняться в местных рефугиумах [32]. Кроме того, с запада эта территория изолирована горными

хребтами (Верхоянский хребет, Становой хребет и Джугджурские горы, Большой Хинганский хребет). Поэтому в этой части ареала многие виды растений и животных обладают значительным генетическим своеобразием. Это показано для ольховника [33], для *Larix* spp. [34] и леммингов *Myopus schisticolor* [35].

Происхождение восточной группы у можжевельника, вероятно, связано с дивергенцией и миграциями из Тибетского плато и прилегающих регионов в направлении на северо-восток Азии по непрерывным горным системам, соединяющим Центральную и Северную Азию. Этим можно объяснить близость популяции можжевельника с Гималаев и всех северо-восточных популяций, нахождение их в одной группе в байесовском анализе. Тибетское плато и прилегающие регионы являются важным центром биоразнообразия в мире из-за высокого видового богатства и обилия эндемичных видов [36]. Эти регионы являются важной областью происхождения и дифференциации для таксонов с межконтинентальным разобщением [37]. Многие широко распространенные группы растений умеренного пояса Северного полушария, имеющие наибольшую диверсификацию в горных районах Азии, возникли в QTP и прилегающих высокогорьях прежде чем мигрировать в другие регионы Северного полушария и подвергнуться дивергенции [38, 39].

С помощью ядерных маркеров мы подтвердили существование одной большой группы европейских и урало-сибирских популяций с низкой степенью дифференциации. При этом и по хлоропластным, и по ядерным маркерам наиболее высокие значения генетического разнообразия наблюдались в северных популяциях. Этот факт, а также отсутствие в этой группе корреляции между генетической структурой и географической свидетельствуют в пользу перигляциального выживания *J. communis* на территории Центральной и Северной Европы, о чем также свидетельствуют результаты Михалыч с соавт. [40]. Генетическая однородность этой группы может быть связана с древним расселением можжевельника из какого-то одного источника, возможно Альп, с дальнейшим выживанием во время LGM в северной части современного ареала во множестве микрорефугиумов.

С помощью ядерных маркеров была выявлена дифференциация горных популяций Центральной Азии (Алтая, Тянь-Шаня), но по сравнению с результатами по хлоропластным маркерам она была значительно слабее. В то же время в отличие от результатов анализа изменчивости хпДНК с помощью ядерных маркеров удалось показать дифференциацию горной популяции *J. communis* с Южного Урала.

Смешанный состав генотипов в альпийской популяции и популяции из Горной Шории позволяет предположить, что эти популяции расположены в местах существования древних рефугиумов. В результате анализа изменчивости хпДНК в альпийских популяциях также были обнаружены гаплотипы из разных генетических линий [17]. Палеоэкологические и филогеографические данные доказали существование ледниковых рефугиумов вдоль юго-западной, южной, восточной и северной границы Альп [41]. В исследовании *Pinus sibirica* группу из Горной Шории также рассматривают как наиболее древнюю [42].

Хотя настоящее исследование сосредоточено на евразийской истории *J. communis* var. *saxatilis* и *J. communis* var. *communis*, некоторые выводы удалось сделать относительно *J. communis* var. *depressa* из Северной Америки. Ядерные маркеры в отличие от хлоропластных не отделили популяцию можжевельника с Аляски от северо-восточных и дальневосточных популяций Евразии. Это может свидетельствовать об их относительно недавнем расхождении и/или отсутствии строгой изоляции. В периоды существования Берингийского моста суши (в миоцене до 5.5–5.4 млн лет назад [43], в плейстоцене 70 и 20 тыс. лет назад [44, 45]) пыльца можжевельника с берегов Чукотки вполне могла достигать берегов Северной Америки. Потом поток пыльцы мог прекращаться, а миграции перелетных птиц в этом направлении, установившиеся в голоцене, могли способствовать расселению на большие расстояния.

Пример подобной неконгруэнтности результатов применения разных типов генетических маркеров известен для кедрового стланика, вида растущего в тех же сообществах, что и можжевельник, и обладающего похожими экологическими требованиями. По митохондриальной филологии *Pinus pumila* относится к американскому кластеру [46], а хлоропластные филологии размещают его в евроазиатском кластере [47].

Таким образом, в отношении можжевельника обыкновенного можно говорить о повторяемости результатов, полученных при помощи разных систем маркеров. Применение ядерных микросателлитов дало также некоторую дополнительную информацию. Однако этого все еще недостаточно, чтобы понять, какие эволюционные силы определили современную генетическую структуру вида, получить целостную картину плейстоценовых миграций, определить время дивергенции разных линий. Необходимы дополнительные исследования.

Мы благодарим М.А. Гурскую, А.А. Галимову, Е.А. Марчук, М.А. Полежаеву и Д.Р. Юнусову за помощь в сборе материала.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Института экологии растений и животных УрО РАН № 122021000090-5.

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. Petit R.J., Aguinagalde I., de Beaulieu J.L. et al. Glacial refugia: Hotspots but not melting pots of genetic diversity // *Science*. 2003. V. 300. P. 1563–1565. <https://doi.org/10.1126/science.1083264>
2. Tribsch A., Stuessy T. Evolution and phylogeography of arctic and alpine plants in Europe: Introduction // *Taxon*. 2003. V. 52. P. 415–416. <https://doi.org/10.2307/3647443>
3. Tarasov P.E., Volkova V.S., Webb T. et al. Last glacial maximum biomes reconstructed from pollen and plant macrofossil data from northern Eurasia // *J. Biogeogr.* 2000. V. 27. P. 609–620. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.2000.00429.x>
4. Maliouchenko O., Palmé A.E., Buonamici A. et al. Comparative phylogeography of two European birch species, *Betula pendula* and *B. pubescens*, with high level of haplotype sharing // *J. Biogeogr.* 2007. V. 34. P. 1601–1610. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2007.01729.x>
5. Gonçalves A., Flores-Félix J.D., Coutinho P. et al. Zimbro (*Juniperus communis* L.) as a promising source of bioactive compounds and biomedical activities: a review on recent trends // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 6. P. 3197. <https://doi.org/10.3390/ijms23063197>
6. Farjon A.A. World Checklist and Bibliography of Conifers. 2nd ed. England, The Royal Bot. Gardens: Kew, 2001. 309 p.
7. Clifton S.J., Ward L.K., Ranner D.S. The status of juniper *Juniperus communis* L. in north-east England // *Biol. Conserv.* 1997. V. 79. P. 67–77. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(96\)00101-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(96)00101-2)
8. McBride A. The status of common juniper (*Juniperus communis* L.) in the Scottish borders // *Scottish Forestry*. 1998. V. 52. P. 178–182.
9. Oostermeijer J.G.B., Knecht B. Genetic population structure of wind-pollinated dioecious shrub *Juniperus communis* in fragmented Dutch heathlands // *Plant Species Biol.* 2004. V. 19. P. 175–184. <https://doi.org/10.1111/j.1442-1984.2004.00113.x>
10. Filipowicz N., Piotrowski A., Ochocka R., Aszemborska M. The phytochemical and genetic survey of common and dwarf juniper (*Juniperus communis* and *Juniperus nana*) identifies chemical races and close taxonomic identity of the species // *Planta Medica*. 2006. V. 72. P. 850–853. <https://doi.org/10.1055/s-2006-941543>
11. Provan J., Hunter A.M., McDonald R.A. et al. Restricted gene flow in fragmented population of a wind-pollinated tree // *Conserv. Genet.* 2000. V. 9. № 6. P. 1521–1532. <https://doi.org/10.1007/s10592-007-9484-y>
12. Van der Merwe M., Winfield M.O., Arnold G.M., Parker J.S. Spatial and temporal aspects of the genetic structure of *Juniperus communis* populations // *Mol. Ecol.* 2000. V. 9. P. 379–386. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.00868.x>
13. Hamrick J.L., Godt M.J.W. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species // *Philos. Trans. Roy. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 1996. V. 351(1345). P. 1291–1298. <https://doi.org/10.1098/rstb.1996.0112>
14. Michalczyk I.M., Sebastiani I.F., Buonamici A. et al. Characterization of highly polymorphic nuclear microsatellite loci in *Juniperus communis* L. // *Mol. Ecol. Notes*. 2006. V. 6. P. 346–348. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01227.x>
15. Reim S., Lochschmidt F., Proft A. et al. Genetic structure and diversity in *Juniperus communis* populations in Saxony, Germany // *Biodivers. Conserv.* 2016. V. 42. P. 9–18. <https://doi.org/10.1515/biorc-2016-0008>
16. Jacquemart A.L., Buyens C., Delescaillie L.-M., Rossum F.V. Using genetic evaluation to guide conservation of remnant *Juniperus communis* (Cupressaceae) populations // *Plant Biol.* 2021. V. 23. № 1. P. 193–204. <https://doi.org/10.1111/plb.13188>
17. Hantemirova E.V., Heinze B., Knyazeva S.G. et al. A new Eurasian phylogeographical paradigm? Limited contribution of southern populations of the recolonization of high latitude populations in *Juniperus communis* L. (Cupressaceae) // *J. Biogeogr.* 2017. V. 44. № 2. P. 271–282. <https://doi.org/10.1111/jbi.12867>
18. Zhang Q., Yang Y.Z., Wu G.L. et al. Isolation and characterization of microsatellite DNA primers in *Juniperus przewalskii* Kom (Cupressaceae) // *Conserv. Genet.* 2008. V. 9. P. 767–769. <https://doi.org/10.1007/s10592-007-9387-y>
19. Rumeu B., Sosa P.A., Nogales M., Gonzalez-Perez M.A. Development and characterization of 13 SSR markers for an endangered insular juniper (*Juniperus cedrus* Webb & Berth.) // *Conserv. Genet. Resources*. 2013. V. 5. P. 457–459. <https://doi.org/10.1007/s12686-012-9827-y>
20. Raymond M., Rousset F. GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism // *J. Hered.* 1995. V. 86. P. 248–249. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x>
21. Brookfield J. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency // *Mol. Ecol.* 1996. V. 5. P. 453–455. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1996.00098.x>
22. Oosterhout C.V., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P. Micro-checker: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data // *Mol. Ecol. Notes*. 2004. V. 4. P. 535–538. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>

23. *Excoffier L., Lischer H.* Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // *Mol. Ecol. Resour.* 2010. V. 10. P. 564–567.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
24. *Nei M., Tajima F., Tateno Y.* Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data // *J. Mol. Evol.* 1983. V. 19. P. 153–170.
<https://doi.org/10.1007/BF02300753>
25. *Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P.* Inference of population structure using multilocus genotype data // *Genetics.* 2000. V. 155. P. 945–959.
<https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
26. *Earl D.A., von Holdt B.M.* Structure harvester: A web-site and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method // *Conserv. Genet. Resour.* 2012. V. 4. P. 359–361.
<https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
27. *Dupanloup I., Schneider S., Excoffier L.* A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations // *Mol. Ecol.* 2002. V. 11. P. 2571–2581.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01650.x>
28. *Mantel N.A.* The detection of disease clustering and generalized regression approach // *Cancer Res.* 1967. V. 27. P. 209–220.
29. *Vanden Broeck A., Gruwez R., Cox K. et al.* Genetic structure and seed-mediated dispersal rates of an endangered shrub in a fragmented landscape: A case study for *Juniperus communis* in northwestern Europe // *BMC Genetics.* 2011. V. 12. P. 1–7.
<https://doi.org/10.1186/1471-2156-12-73>
30. *Ritland C., Pape T., Ritland K.* Genetic structure of yellow cedar (*Chamaecyparis nootkatensis*) // *Can. J. Bot.* 2001. V. 79. P. 822–828.
<https://doi.org/10.1139/b01-053>
31. *Somme L., Mayer C., Rasp E.O., Jacquemart A.L.* Influence of spatial distribution and size of clones on the realized outcrossing rate of the marsh cinquefoil (*Comarum palustre*) // *Annals Botany.* 2014. V. 113. P. 477–487.
<https://doi.org/10.1093/aob/mct280>
32. *Егорова И.А.* Краткий очерк истории формирования современной растительности Камчатки // Камчатка: события, люди: Материалы XXV Крашенинниковских чтений. Петропавловск-Камчатский, 2008. С. 88–93.
33. *Hantemirova E.V., Marchuk E.A.* Phylogeography and genetic structure of a subarctic-alpine shrub species, *Alnus alnobetula* (Ehrh.) K. Koch s. l., inferred from chloroplast DNA markers // *Tree Genet. Genom.* 2021. V. 17. P. 18.
<https://doi.org/10.1007/s11295-021-01503-0>
34. *Polezhaeva M.A., Lascoux M., Semerikov V.L.* Cytoplasmic DNA variation and biogeography of *Larix* Mill. in Northeast Asia // *Mol. Ecol.* 2010. V. 19. P. 1239–1252.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04552.x>
35. *Fedorov V., Goropashnaya A.V., Boeskorov G.G., Cook J.A.* Comparative phylogeography and demographic history of the wood lemming (*Myopus schisticolor*): Implications for late Quaternary history of the taiga species in Eurasia // *Mol. Ecol.* 2008. V. 17. P. 598–610.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03595.x>
36. *Myers N., Mittermeier R.A., Mittermeier C.G. et al.* Biodiversity hotspots for conservation priorities // *Nature.* 2000. V. 403. P. 853–858.
<https://doi.org/10.1038/35002501>
37. *Zhang J.-Q., Meng S.-Y., Allen G.A. et al.* Rapid radiation and dispersal out of the Qinghai-Tibetan Plateau of an alpine plant lineage *Rhodiola* (Crassulaceae) // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2014. V. 77. P. 147–158.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.04.013>
38. *Zhang H.J., Feng T., Landis J.B. et al.* Molecular phylogeography and ecological niche modeling of *Sibbaldia procumbens* s.l. (Rosaceae) // *Front Genet.* 2019. V. 10. P. 201.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00201>
39. *Jia D.R., Abbott R.J., Liu T.L. et al.* Out of the Qinghai-Tibet Plateau: Evidence for the origin and dispersal of Eurasian temperate plants from a phylogeographic study of *Hippophae rhamnoides* (Elaeagnaceae) // *New Phytol.* 2012. V. 194. P. 1123–1133.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04115.x>
40. *Michalczyk I.M., Opgenoorth L., Luecke Y. et al.* Genetic support for periglacial survival of *Juniperus communis* L. in Central Europe // *Holocene.* 2010. V. 20. № 6. P. 887–894.
<https://doi.org/10.1177/0959683610365943>
41. *Schönswetter P., Stehlik I., Holderegger R., Tribsch A.* Molecular evidence for glacial refugia of mountain plants in the European Alps // *Mol. Ecol.* 2005. V. 14. P. 3547–3555.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02683.x>
42. *Shuvaev D.N., Ibe A.A.* Genetic structure and postglacial recolonization of *Pinus sibirica* Du Tour in the West Siberian Plain, inferred from nuclear microsatellite markers // *Silvae Genet.* 2021. V. 70. P. 99–107.
<https://doi.org/10.2478/sg-2021-0008>
43. *Mao K., Hao G., Liu J. et al.* Diversification and biogeography of *Juniperus* (Cupressaceae): variable diversification rates and multiple intercontinental dispersals // *New Phytol.* 2010. V. 188. P. 254–272.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03351.x>
44. *Величко А.А.* Природный процесс в плейстоцене. М., 1973. 256 с.
45. *Elias S.A., Short S.K., Birks H.H.* Late Wisconsin environments of the Bering Land Bridge // *Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol.* 1997. V. 136. P. 293–308.
46. *Tsutsui K., Suwa A., Sawada K.S. et al.* Incongruence among mitochondrial, chloroplast and nuclear gene trees in *Pinus* subgenus *Strobos* (Pinaceae) // *J. Plant. Res.* 2009. V. 122. P. 509–521.
<https://doi.org/10.1007/s10265-009-0246-4>
47. *Gernandt D.S., Lopez G.G., Garcia S.O., Liston A.* Phylogeny and classification of *Pinus* // *Taxon.* 2005. V. 54. V. 1. P. 29–42.
<https://doi.org/10.2307/25065300>

Genetic Diversity of *Juniperus communis* L. in Eurasia and Alaska, Inferred from Nuclear Microsatellites Markers

E. V. Hantemirova^{a, *} and V. A. Bessonova^a

^a*Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, 620144 Russia*

^{*}*e-mail: hantemirova@ipae.uran.ru*

The structure of genetic variation of the common juniper (*Juniperus communis* L.), a widespread wind-pollinated golarctic shrub of Cupressaceae was surveyed. We used 7 microsatellite markers including three new to genotype samples from 23 Eurasian populations and one from North America (Alaska). The geographical patterns are interpreted jointly with our previously available chloroplast DNA data. High genetic diversity was revealed with highest values in the same northern populations (Sweden, Estonia, Mezen, Polar Urals, Yamal, Kolyma, as well as in the Alps) as previously identified at cpDNA analysis. Nuclear markers exhibited a lower level interpopulation differentiation ($F_{ST} = 9.8\%$) than chloroplast markers ($F_{ST} = 76\%$). Bayesian cluster analysis showed that the optimal number of genetic groups (K) was two. All the 24 populations of *J. communis* were divided into the East group (north-east and Far East of Russia, Alaska and Himalayan) and the West group (Europe, Ural and Siberia). In the Alpine and Mountain Shoria populations, genotypes from different genetic groups are combined.

Keywords: *J. communis*, nuclear microsatellites, SSR markers, genetic diversity.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *HAP2/GCS1*, *GEX2* У ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ САРАТОВСКОЙ СЕЛЕКЦИИ

© 2023 г. Е. М. Моисеева¹, Ю. С. Гусев^{1, 2}, О. В. Гуторова², М. И. Чумаков^{1, *}

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов — обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра “Саратовский научный центр Российской академии наук”, Саратов, 410049 Россия

²Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, 410012 Россия

*e-mail: chumakov_m@ibppm.ru

Поступила в редакцию 11.05.2022 г.

После доработки 20.07.2022 г.

Принята к публикации 25.07.2022 г.

Исследование явления гаплоиндукции представляет научный и практический интерес в связи с разработкой эффективных методов получения гаплоидов, необходимых, в частности, для ускоренного создания гомозиготных линий. Обсуждается связь индукции образования гаплоидов у линии кукурузы саратовской селекции Зародышевый маркер саратовский пурпурный (ЗМСП) с генами *HAP2/GCS1* и *GEX2*, контролирующими адгезию и слияние мембран гамет у кукурузы. С помощью метода ПЦР-РВ установлено, что гены *GEX2*, *HAP2/GCS1* экспрессируются не только в спермиях, но и в женских генеративных структурах кукурузы, но гаплоиндуцирующая способность кукурузы не коррелирует с уровнем их экспрессии. Было показано, что ген *GEX2* у гаплоиндуцирующей линии ЗМСП имеет 27 однонуклеотидных замен, вставку размером в девять нуклеотидов и одну двухнуклеотидную замену и соответственно десять аминокислотных замен и две вставки в белке *GEX2*, по сравнению с референсной линией В73. Эти замены, возможно, оказывают воздействие на конформацию белка и процесс взаимодействия мембран гамет. Более эволюционно консервативный белок *HAP2/GCS1*, обеспечивающий слияние мембран гамет кукурузы, у линии кукурузы ЗМСП имеет только одну аминокислотную замену, по сравнению с линиями Коричневый маркер и В73.

Ключевые слова: кукуруза, *Zea mays*, гены гиногенеза, экспрессия.

DOI: 10.31857/S0016675823030098, **EDN:** IPZWVS

У высших растений развитие семян начинается с двойного оплодотворения, открытого С.Г. Навашиным в 1898 г. [1]. После попадания пыльцы кукурузы на рыльце вегетативная клетка пыльника зерна образует пыльцевую трубку, с помощью которой два спермия доставляются к зародышевому мешку. Один спермий ($1n$) сливается с яйцеклеткой ($1n$), второй ($1n$) — с центральной клеткой ($2n$). Из оплодотворенной яйцеклетки развивается диплоидный зародыш. Центральная клетка с двумя полярными ядрами ($2n$) в результате слияния со вторым спермием ($1n$) образует триплоидный эндосперм ($3n$) [2].

При нарушении двойного оплодотворения у покрытосеменных растений может формироваться партеногенетический гаплоидный зародыш ($1n$) из неоплодотворенной или оплодотворенной дефектными спермиями яйцеклетки (гиногенез). У современных сортов кукурузы независимое от оплодотворения развитие зародыша (гиногенез или матроклинный партеногенез, как частный

случай) встречается крайне редко (0.1–0.01%) [3]. Однако 60 и более лет назад были выведены линии кукурузы с повышенной способностью к индукции гаплоидов (гаплоиндукторы). К ним относятся линии РЕМ [4], Stock 6 [3] и линии, полученные с использованием Stock 6: ЗМС, ЗМС-8, КМС (Саратов, Россия) [5]; Краснодарский маркер (Краснодар, Россия) [6]; МН1 (Молдова) [7, 8] и некоторые другие [9, 10]. Было предположено, что способность саратовских линий ЗМС и КМС к индукции гаплоидов может быть обусловлена нарушением функции спермиев, которые не могут достичь яйцеклетки и/или слиться с ней [5, 11–13]. Однако причины и механизм повышенной гаплоиндуцирующей способности у саратовских линий-гаплоиндукторов кукурузы по сравнению с Stock 6 неясны.

С использованием линии Stock 6 были также получены партеногенетическая линия АТ-1 (Саратов) и ее производная линия АТ-3 с высокой частотой партеногенеза (с наследуемой матроклин-

ной гаплоидией) [14–16]. Кроме партеногенеза у линии АТ-3 наблюдаются полиэмбриония и начало эндоспермогенеза без опыления, но эти линии не являются гаплоиндукторами [16].

Механизмы формирования гаплоидов кукурузы могут быть разными: партеногенетическое развитие зародыша из неоплодотворенной яйцеклетки, апогамия (партеногенетическое развитие зародыша из яйцеклеткоподобных синергид или антипод), гиногенез (явление, при котором после оплодотворения ядро спермия не сливается с ядром яйцеклетки, а затем дегенерирует, и в развитии зародыша участвует только ядро яйцеклетки), андрогенез. За последние 5–7 лет были изучены некоторые молекулярно-генетические аспекты формирования гаплоидов кукурузы [10].

Один из механизмов образования матроклиных гаплоидов у кукурузы был открыт в 2017 г., когда три научные группы независимо опубликовали пионерские данные по расшифровке спонтанной мутации в одном из генов у линии Stock 6 [17–19]. Нуклеотидная последовательность, которая кодирует белок фосфолипазу А, получила разные обозначения (в порядке появления публикаций): MATRILINEAL (*MTL*) [17], NOT LIKE DAD (*NLD*) [18], *PLA1* [19]. Вставка четырех нуклеотидов в четвертый экзон гена, кодирующего фосфолипазу А у линии Stock 6, сдвинула рамку считывания, изменив 20 аминокислот [19]. Если такую вставку произвести в ген, кодирующий фосфолипазу у обычной линии (негаплоиндуктора), то это приводит к появлению фенотипа аналогичного фенотипу Stock 6 и дает до 2% гаплоидов в потомстве [19].

Эта спонтанная мутация у линии Stock 6 была унаследована линиями, полученными с ее участием [9]. Фермент фосфолипаза А участвует в биодеградации фосфолипидов и в синтезе линоленовой кислоты. Однако авторы, открывшие ген индукции матроклиных гаплоидов [17–19], не уточнили его роль в гаплоиндукции. Возможно, что эта мутация в результате неправильного функционирования фермента приводит к изменениям липидного состава мембраны и следовательно к изменениям ее свойств, что, возможно, приводит к потере способности мембраны спермия взаимодействовать и сливаться с мембраной яйцеклетки и центральной клетки [20]. Можно предположить, что мутации по генам, кодирующим белки, которые участвуют во взаимодействии (адгезии) и слиянии мембран спермия с яйцеклеткой и центральной клеткой, тоже могут привести к нарушениям двойного оплодотворения.

Одной из причин нарушения двойного оплодотворения могут быть нарушения во взаимодействии между мембранами гамет. Первые данные о гене (*HAP2/GCS1* (*HAPLESS2/Generative Cell Specific 1*)), контролирующем взаимодействие мембран гамет у

Arabidopsis thaliana, были опубликованы независимо исследователями из Японии [21] (электронная публикация 25 декабря 2005 г.) и США [22]. Белок HAP2(GCS1) необходим для слияния мембран спермия и яйцеклетки, центральной клетки у *A. thaliana* [23]. Положительный заряд в С-концевой области необходим для функционирования белка HAP2(GCS1) во время слияния гамет [24]. Была показана значительная (69%) гомология между геном *HAP2/GCS1 A. thaliana* и последовательностью ZM_BFb0162K03 (1921 нм) у кукурузы, которая содержит консервативную область, полностью идентичную соответствующим областям у *A. thaliana* и лилии (*Lilium longiflorum*) [25]. Экспрессия гена *HAP2/GCS1* в кукурузе неспецифична для спермиев, поскольку мРНК была обнаружена в образцах, выделенных из завязей, корней и листьев [25], а также из семян, початков и незрелых метелок [26, 27]. Роль белка HAP2/GCS1 в способности индуцировать гаплоиды еще не доказана.

Эксперименты по картированию с мутантами показали, что ген *GEX2* (*gamete expressed 2*, At5g49150) контролирует раннее взаимодействие (адгезию) гамет у *A. thaliana* [28]. Белок EC1, секретируемый женскими гаметами, запускает активацию белков HAP2/GCS1 и GEX2 и их экспонирование на поверхности мембраны спермиев (см. обзоры [20, 23]). Мембранный белок GEX2 необходим для начала взаимодействия спермия (прикрепления, адгезии) с мембраной яйцеклетки и центральной клетки *A. thaliana* [23]. У мутантов по гену *GEX2* нарушается способность к адгезии и, как следствие, к слиянию мембран спермиев с яйцеклеткой и центральной клеткой, что приводит к образованию семян, содержащих либо гаплоидный зародыш, либо неправильно формирующийся эндосперм. Предполагается, что у саратовских линий кукурузы однократное оплодотворение является результатом функциональных дефектов у спермиев, которые приводят к образованию гаплоидных зародышей [11].

Известны также некоторые другие гены, при мутации в которых растения приобретают способность к гаплоиндукции. Установлено, что у *A. thaliana* появление гаплоидов в потомстве связано, в том числе, с мутацией в белке гистона H3, специфичном для центромеры — CENH3. Эта мутация приводит к хромосомной несовместимости и потере части или полного набора отцовских хромосом в первых делениях зиготы (анеуплоидия) [29]. У линий-гаплоиндукторов кукурузы, полученных при скрещиваниях с линией Stock 6, также наблюдалась частичная или полная элиминация хромосом [30–32]. Напомним, что линия Stock 6 и ее производные при использовании их в скрещивании в качестве отцовского родителя (индуцированный гиногенез) индуцируют гаплоиды в количестве 2–3% [33]. В отличие от *A. thaliana*, у которого при

мутации в гене *CENH3* возникает анеуплоидия и гаплоидия, у кукурузы элиминируются хромосомы мужского родителя после оплодотворения на ранних стадиях развития зародыша, приводя к гаплоидии (до 3.6%) [32].

Мембранный домен белка DUF679, кодируемый геном *DMP9*, экспрессируется в мембранах женских и мужских гамет *A. thaliana* и регулирует их контакт [34]. У *A. thaliana* нокаут этого гена нарушает оплодотворение яйцеклетки в большей степени, чем оплодотворение центральной клетки [35]. Роль гена *DMP* в индукции гаплоидов кукурузы была показана с помощью геномного редактирования (CRISPR-Cas9) в экспериментах по нокауту генов [36].

Ген *PSASGR-BBML* относится к семейству *APETALA2/(AP2/ERF)*, экспрессируется в яйцеклетке до оплодотворения и его роль в индукции партеногенеза была показана для проса [37], кукурузы и риса [38].

Таким образом, установлено несколько генов, которые контролируют появление матроклиных гаплоидов у кукурузы: *PLA1*, *DMP*, *CENH3*, *BBML*. В представленной статье мы обсуждаем индукцию образования гаплоидов, предположительно связанную с нарушением взаимодействия гамет, в частности с генами, контролирующими адгезию и слияния мембран гамет (*HAP2/GCS1*, *GEX2*) у гаплоиндуцирующих линий кукурузы саратовской селекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал

В настоящей работе были использованы линии кукурузы саратовской селекции (Зародышевый маркер саратовский пурпурный (ЗМСП) и ГПЛ-1) и линия Коричневый маркер (КМ). У линии ЗМСП, отобранной из потомства самоопыляемых гибридов материнской линии Зародышевый маркер саратовский (ЗМС-8) [39] и отцовской линии-гаплоиндуктора Коричневый маркер саратовский (КМС, Саратов), частота гаплоиндукции достигает 10% [40]. Линии ЗМС-8 и КМС с частотой гаплоиндукции до 6–8% [39] являются прямыми потомками линии-гаплоиндуктора Stock 6 [9]. В качестве контроля использовали негаплоиндуцирующие линии КМ и ГПЛ-1. Линия КМ, созданная С.С. Чейзом (Chase) [41], была получена из Национального зернового центра им. Лукьяненко (Краснодар, Россия). Диплоидная линия ГПЛ-1 была получена на кафедре генетики Саратовского государственного университета (Саратов, Россия) путем обработки колхицином гаплоидного растения кукурузы линии Кинельская 113 (Федеральный центр сельскохозяйственных исследований Юго-Восточного региона, Саратов, Россия [11]).

Все линии были выращены на полях Российского научно-исследовательского, проектно-тех-

нологического института сорго и кукурузы (Институт Россорго; Саратов, Россия) в 2020 г. и на опытном участке Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Саратовского научного центра Российской академии наук (Саратов) в 2021 г.

Початки кукурузы были изолированы с помощью пергаментных пакетов до того, как появились пестичные нити (конец июля–начало августа). Для получения зародышей предварительно изолированные початки опыляли вручную пыльцой других растений кукурузы и собирали початки через семь дней после опыления (7 ДПО). Часть образцов этой же линии была собрана через семь дней после появления рылец (7 ДППР) из предварительно изолированных початков без опыления. Все собранные початки были помещены в контейнеры со льдом, доставлены в лабораторию и заморожены при температуре -20°C .

Экспрессия генов GEX2, HAP2/GCS1 в тканях кукурузы

Тотальную РНК выделяли из 100 мг предварительно замороженных (-20°C) завязей, извлеченных из початков (7 ДППР или 7 ДПО), с использованием набора для экстракции РНК (Евроген, Россия), согласно инструкции производителя. Из 100 мг предварительно замороженных (-20°C) пылевых зерен РНК выделяли с использованием метода SDS/βME [42] с модификациями: пылевые зерна измельчали в предварительно замороженной (-20°C) ступке, а фенол исключали из смеси хлороформ : изоамиловый спирт : фенол.

Для синтеза кДНК проводили обратную транскрипцию мРНК с помощью обратной транскриптазы (номер по каталогу EP0442; Thermo Fisher Scientific, США) и с oligo (dT) праймерами (Евроген, Россия). Концентрацию кДНК измеряли на флуориметре Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, Сингапур) с использованием набора для анализа RNA BR assay (Q32850; Thermo Fisher Scientific, США). Для всех образцов концентрация кДНК доведена до 2 нг путем разбавления более высокой концентрации. ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) проводили на ПЦР-анализаторе Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием набора реагентов для ПЦР в реальном времени в присутствии красителя SYBR Green и пассивного референсного красителя ROX (номер по каталогу M-435; Синтол, Россия).

Для оценки экспрессии гена *GEX2* методом ПЦР были подобраны праймеры с помощью ресурса Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) таким образом, чтобы один из праймеров располагался в ме-

Таблица 1. Праймеры для амплификации фрагментов генов *GEX2* и *HAP2/GCS1* для дальнейшего секвенирования

Праймеры для гена <i>HAP2/GCS1</i>	Праймеры для гена <i>GEX2</i>
GCCCGCTCGACTCTTCTT/ TGAAGGTACACGGCGGTTAG	CGCAAATGGGTCTGGTTTGG/ ACTTGCAGATGTCAGCCGAA
GACACGCAAATGTGAACCAG/ TGTTACATTTCGACACCGTCTG	AGCTGCCTCCATGTCCATTTC/ GGTTCTTCGCACACCGTTTC
GCCCGCTCGACTCTTCTT/ CTGATGTAGTTGAGGGCGTAGA	GAAACGGTGTGCGAAGAACC/ TCACAGCGATGGACAAGGTC
GCACGTTAACGACACAAAG/ AACTTGTACCCTGATGTTGAACC	GCTAGAAGTCCTGGAGGGGA/ ACTCGATCTGCTTGACACAA
GCATGATCTTGAAGAACCAA/ AACTTGTACCCTGATGTTGAACC	CGTTGGATACTCCCCTGCTA/ CTATTGTTTACGGCCCCAGA
AAGGAAAAGCTAATACGGCTCA/ TGTTACATTTCGACACCGTCTG	TTTGCCAGTTGCGATCAATA/ CCACACCGAAACAGTGTCAT
CCATGTTTTTGAATTGGAAC/ TGTTACATTTCGACACCGTCTG	GTTTCAGCCCTGTCGTCGT/ AGAGCCGTTGGGGTAGGAG
AAGAAATCCCCCTGTCATCA/ GGCTCACCCTACCAGCACT	GGGTATTTACCCATTGCCATC/ ACGACGACAGGGCTGAAC
GGTGAGCCACAAAACCTTGG/ CATCCTTGTCTGTCGAGTTCAC	TCACTTGGGTTGGGGGTTAT/ CGGTGACGTAGCTGCTGTT
ACCGGAGGCACAAGAAAG/ CCCACGGTACACCAACTTCA	CTGGCTACTTCAGGGTCTCG/ GGGTCCATCTGGTTCTCTCA
TCAGAGGAGTCCAGGGAATA/ GGTGATGGTGGTCGTGGT	

сте соединения двух экзонов, что обеспечивает амплификацию только с матрицы кДНК.

В работе использовали праймеры: для гена *GEX2* – TGTTCGGTGTGGGAGGATG/TGAC-CCGTGAAGTGGAGAAG, для гена *GCS1* – TCG-GTTCAAATGGCTACAAA/TAGCAGCACCAACA-TGACGA, для гена *UBCE* – ACAAAACCCTCTC-CCTCCTGT/GGTAGATGCGACCCTCATGT.

Для каждой точки данных ПЦР выполнялась в четырех технических повторах для одной кДНК. Было проведено два или три независимых биологических эксперимента. В качестве эндогенного контроля использовали ген, кодирующий убиквитин-конъюгирующий фермент (*UBCE*) [43]. Относительные уровни экспрессии генов рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta CT}$ [44] с нормализацией к экспрессии целевого гена у линии ЗМСП (7 ДПО). Мы считали, что значения не различаются, если разница между вариантами была <1.3 раза, как предполагается в работе [45].

Секвенирование РНК

Для секвенирования кДНК выделяли РНК из пыльцы линий кукурузы ЗМС-8, ЗМСП и КМ, как описано выше. Для получения ПЦР-продуктов для последующего секвенирования генов *GEX2*

и *HAP2/GCS1* использовали праймеры, приведенные в табл. 1.

Поскольку последовательности транскриптов гена *HAP2/GCS1*, аннотированные в базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100274016>), имели отличия в основном в начальном фрагменте, мы выбрали также пары праймеров для идентификации всех транскриптов поначальному фрагменту (табл. 1).

Для ПЦР и секвенирования региона гена *PLAI*, в который произошла вставка 4 пн у линии Stock 6, использовали праймеры ATGTTCCAGTC-GCTCCACAG/ATATCGTAGGGCGCACATCT.

ПЦР-продукты экстрагировали из агарозного геля, очищали с помощью набора Cleanup Standard (Евроген, Россия) и секвенировали в компании Евроген. Сравнение нуклеотидных последовательностей транскриптов разных линий проводили с помощью программы Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Предварительно, с использованием программы Blast проводили выравнивание прочтений с прямыми и обратными праймерами. Учитывали также качество сигнала и вероятность ошибки на хроматограмме с помощью программы Chromas (<http://technelysium.com.au/wp/chromas/>). Собранные транскрипты

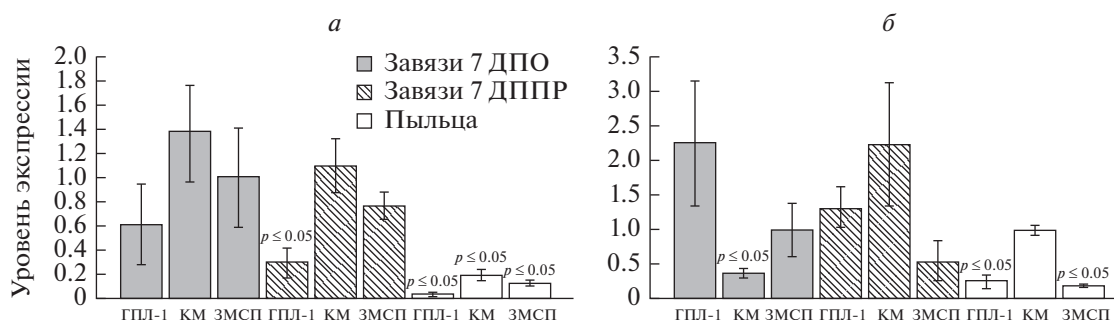


Рис. 1. Экспрессия генов *GEX2* (а) и *HAP2/GCS1* (б) в пыльце и завязях (без опыления – 7 дней после появления рылец (7 ДППР)) и 7 дней после опыления (7 ДПО) линий ГПЛ-1, КМ и ЗМСП. ПЦР-РВ проводилась в четырех технических повторях для одного образца кДНК и в трех биологических повторях для каждого варианта. В качестве эндогенного контроля использовали ген *UBCE* (см. Материалы и методы). Относительные уровни экспрессии генов рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta CT}$ [44] с нормализацией к экспрессии целевого гена в линии ЗМСП. * Значимые различия между образцом и калибратором (завязи ЗМСП, 7 ДПО) обозначены как $p \leq 0.05$.

генов *GEX2* линий ЗМСП и КМ (3646 пн) были представлены нами в базу данных GenBank (MN617022.2, OL649773.1 и MW195549.1).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Линия кукурузы Stock 6 дает максимальную частоту гаплоидов 3.2% [3], в то время как гаплоиндуцирующие линии саратовской селекции на основе Stock 6 дают более высокие частоты появления гаплоидов в их потомстве $\approx 8\%$ (ЗМС-8) [13] и даже до 10% (ЗМСП) [40]. Наши результаты секвенирования показали, что линии-гаплоиндукторы саратовской селекции ЗМС-8 и ЗМСП имеют те же вставки четырех нуклеотидов (данные не показаны) в ген *PLAI*, кодирующий фосфолипазу А, что и у линии Stock 6 [19]. Однако не известно связаны ли повышенные частоты гаплоиндукции у гаплоиндуцирующих линий саратовской селекции ЗМС-8 и ЗМСП с функцией каких-либо из ранее обнаруженных генов генома. Мы исследовали экспрессию генов *GEX2*, *HAP2/GCS1* в пыльце и неоплодотворенных завязях из неопыленных початков через семь дней после появления рылец (7 ДППР) и в завязях через 7 дней после опыления (7 ДПО) у гаплоиндуцирующей (ЗМСП) и двух негаплоиндуцирующих линий (ГПЛ-1, КМ). А также секвенировали гены *GEX2*, *HAP2/GCS1* линий ЗМСП и КМ.

GEX2

Ген *GEX2* экспрессируется в зрелой пыльце, бутонах и открытых цветках *A. thaliana* [28]. В пестиках его экспрессия выражена в гораздо меньшей степени, чем в пыльниках [46]. Ген *GEX2* кукурузы высоко и специфично экспрессируется в спермиях, как показано с помощью секвенирования РНК [26, 27]. Однако данных об экспрессии *GEX2* в других тканях кукурузы нет. В настоящем

исследовании мы впервые наблюдали экспрессию гена *GEX2* в завязях кукурузы до и после оплодотворения (рис. 1, а).

Гаплоиндуцирующая линия ЗМСП не отличалась по экспрессии гена *GEX2* в исследованных тканях (завязях до и после опыления и пыльце) от контрольной линии КМ, но демонстрировала повышенную экспрессию в неопыленных завязях (7 ДППР) и в пыльце, в сравнении с другой контрольной линией ГПЛ-1 (рис. 1, а). В целом можно отметить, что исследованные линии кукурузы отличаются по экспрессии генов *GEX2*, но уровень экспрессии не коррелирует со способностью линии ЗМСП к гаплоиндукции, поскольку может значительно различаться у контрольных линий (КМ, ГПЛ-1), которые не обладают способностью к гаплоиндукции.

Мы также секвенировали транскрипт гена *GEX2* с целью выявления мутаций. У трех линий было обнаружено 59 однонуклеотидных замен (ОНЗ) в последовательностях гена *GEX2*. В частности, нуклеотидная последовательность гена *GEX2* у линии ЗМСП имела делецию одного нуклеотида в положении 506 н, а также 27 и 34 ОНЗ по сравнению с В73 и КМ соответственно (не показано). У линии ЗМСП была также обнаружена вставка из девяти нуклеотидов и одна двухнуклеотидная замена по сравнению с линией В73. Следует отметить, что линии ЗМСП и КМ имели одинаковую вставку из девяти нуклеотидов в положениях 3096–3104 н по сравнению с В73 (не показано).

Мы исследовали влияние ОНЗ, делеций и вставок в гене *GEX2* на аминокислотную последовательность белка GEX2 и обнаружили 15 несоответствий между аминокислотными последовательностями белков GEX2 у линий КМ и ЗМСП (рис. 2).

Кроме того, в аминокислотной последовательности белка GEX2 у линии ЗМСП, по сравнению с последовательностью белка В73, обнаружено 10

GEX2-B73	WTVSFVPLRAGKFAALIGE	RFVPAEWPLTFTVAAAGVHPSASRASWT	FADRRVVAGYRA	180
GEX2-KM	WTVSFVPLRAGKFAALIGE	RFVPAEWPLTFTVAAAGVHPSASRASWT	FADRRVVAGYRA	180
GEX2-3МСП	WTVSFVPLRAGKFAALIGE	RFVPAEWPLTFTVAAAGVHPSASRASWT	FADRRVVAGYRA	180

GEX2-B73	LCGNIVLNGGNPYAMTVLPV	INTSLSRVVKFDPKVRLSIENEVVRLVDS	FMNPVLESSK	540
GEX2-KM	LCGNIVLNGGNPYAMTVLPV	INTSLSRVVKFDPKVRLSIENEVVRLVDS	FMNPVLESSK	540
GEX2-3МСП	LCGNIVLNGGNPYAMTVLPV	INTSLSRVVKFDPKVRLSIENEVVRLVDS	FMNPVLESSK	540

GEX2-B73	SKLKFRLLTSASTTTPVTTTT	SFVKEFVNNSDGSYTGHYAAGGLGSYGICVL	FEDKQLP	600
GEX2-KM	SKLKFRLLTSASTTTPVTTTT	SFVKEFVNNSDGSYTGHYAAGGLGSYGICVL	FEDKQLP	600
GEX2-3МСП	SKLKFRLLTSASTTTPVTTTT	SFVKEFVNNSDGSYTGHYAAGGLGSYGICVL	FEDKQLP	600

GEX2-B73	CPFEVTVHADEYFSDVKND	TVSVWEDESVSFDVLSNDRIAGSKAEIANSSS	PLHGSLVQF	660
GEX2-KM	CPFEVTVHADEYFSDVKND	TVSVWEDESVSFDVLSNDRIAGSKAEIANSSS	PLHGSLVQF	660
GEX2-3МСП	CPFEVTVHADEYFSDVKND	TVSVWEDESVSFDVLSNDRIAGSKAEIANSSS	PLHGSLVQF	660

GEX2-B73	GQTYRYTPFGGFFGND	SFSYTVRDEHNNVVTATVFISVLCRPPQFVSL	PEKLVHVTEDTIS	720
GEX2-KM	GQTYRYTPFGGFFGND	SFSYTVRDEHNNVVTATVFISVLCRPPQFVSL	PEKLVHVTEDTIS	720
GEX2-3МСП	GQTYRYTPFGGFFGND	SFSYTVRDEHNNVVTATVFISVLCRPPQFVSL	PEKLVHVTEDTIS	720

GEX2-B73	PLFGGFPGMKMYSDTTEN	ISVTVAQSGSVSFDVRIKLGQFSEDVLSISSR	GGKDLVL	780
GEX2-KM	PLFGGFPGMKMYSDTTEN	ISVTVAQSGSVSFDVRIKLGQFSEDVLSISSR	GGKDLVL	780
GEX2-3МСП	PLFGGFPGMKMYSDTTEN	ISVTVAQSGSVSFDVRIKLGQFSEDVLSISSR	GGKDLVL	780

GEX2-B73	SILLSGNESWEGYRIFDK	NRDTFEFSIVDPDYNFPGKSSFFLVLSLEV	LEGLTLVTL	900
GEX2-KM	SILLSGNESWEGYRIFDK	NRDTFEFSIVDPDYNFPGKSSFFLVLSLEV	LEGLTLVTL	900
GEX2-3МСП	SILLSGNESWEGYRIFDK	NRDTFEFSIVDPDYNFPGKSSFFLVLSLEV	LEGLTLVTL	900

GEX2-B73	HGTTLSIAVNDQANHGCY	PDCSERMTPLSTAKTIRLVPP	PREVVAGALVGHVSSRRAIL	1017
GEX2-KM	HGTTLSIAVNDQANHGCY	PDCSERMTPLSTAKTIRLVPP	PREVVAGALVGHVSSRRAIL	1020
GEX2-3МСП	HGTTLSIAVNDQANHGCY	PDCSERMTPLSTAKTIRLVPP	PREVVAGALVGHVSSRRAIL	1020

GEX2-B73	FRWLAAAGIVVMLCQGC	VLMCCLFKCMRALKSERRHKTYGQIRAPEQT	APFRONMCAS	1077
GEX2-KM	FRWLAAAGIVVMLCQGC	VLMCCLFKCMRALKSERRHKTYGQIRAPEQT	APFRONMCAS	1080
GEX2-3МСП	FRWLAAAGIVVMLCQGC	VLMCCLFKCMRALKSERRHKTYGQIRAPEQT	APFRONMCAS	1080

GEX2-B73	QREDVGYS	PATATASQLGASRSSLRQ	RSRSCNQEMELQPVSGAVNNRNEGSRPVS	YKDK 1137
GEX2-KM	QREDVGYS	PATATASQLGASRSSLRQ	RSRSCNQEMELQPVSGAVNNRNEGSRPVS	YKDK 1140
GEX2-3МСП	QREDVGYS	PATATASQLGASRSSLRQ	RSRSCNQEMELQPVSGAVNNRNEGSRPVS	YKDK 1140

Рис. 2. Фрагменты белков GEX2 у линий B73, KM и 3МСП с измененными аминокислотными последовательностями. Парные совпадающие аминокислоты отмечены серым цветом, а замены и делеции аминокислот отмечены белыми буквами на черном фоне. Выравнивание последовательностей белков было выполнено с помощью ClustalO (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>).

аминокислотных замен и две вставки (рис. 2). Можно предположить, что изменения аминокислотной последовательности в белке GEX2 у линии 3МСП могут влиять на его конформацию и функцию во время адгезии мембран гамет и быть связаны с индукцией гаплоидов.

Белок GEX2 необходим для прикрепления (адгезии) спермия как к яйцеклетке, так и к центральной клетке [23]. Однако рецептор для белка GEX2 спермия в мембранах яйцеклетки и центральной клетки неизвестен. Ранее было предположено, что у саратовских линий кукурузы может быть нарушена функция спермиев, которые не могут прикрепиться к мембране яйцеклетки [11].

Мы обнаружили ряд аминокислотных замен у белка GEX2 линий 3МСП и KM (рис. 2). Чтобы определить могут ли эти аминокислотные замены в белке GEX2 изменять его конформацию, предстоит выяснить трехмерную структуру белка GEX2 у линий кукурузы 3МСП (гаплоиндуктор) и KM (негаплоиндуктор).

HAP2/GCS1

Экспрессия гена *HAP2/GCS1* у *A. thaliana* ранее считалась спермий-специфичной [21, 22]. Позже, однако, было показано, что транскрипт этого гена присутствует в завязях и плодах *A. thaliana* [47]. Из данных РНК-секвенирования следует, что экспрессия гена *HAP2/GCS1* в зрелых пыльниках кукурузы практически отсутствует [26, 27]. Ген *HAP2/GCS1* экспрессируется в пыльце кукурузы, завязях и корнях [25], а также в листьях, семенах, початках и незрелых метелках [26, 27]. Экспрессия гена *HAP2/GCS1* в вегетативных тканях предполагает, что этот ген участвует не только в слиянии гамет, но, возможно, и в других процессах в тканях кукурузы.

В наших исследованиях зарегистрирована высокая экспрессия гена *HAP2/GCS1* в завязях всех исследованных линий кукурузы как до, так и после оплодотворения (рис. 1,б). Экспрессия гена *HAP2/GCS1* в пыльце и завязях линии 3МСП после оплодотворения (7 ДПО) существенно не отличалась от таковой в ГПЛ-1 (7 ДПО). Однако в неопыленных завязях линии 3МСП (7 ДППР) экспрессия гена *HAP2/GCS1* была в 2.4 раза ниже, чем

у ГПЛ-1 (7 ДППР). Экспрессия гена *HAP2/GCS1* у линии ЗМСП в пыльце и в неопыленных завязях (7ДППР) в 5 и 4 раза соответственно ниже по сравнению с линией КМ. Однако после оплодотворения в завязях (7 ДПО) у линии ЗМСП экспрессия гена *HAP2/GCS1* выше в 2.7 раза по сравнению с линией КМ (7 ДПО). Самая высокая экспрессия гена *HAP2/GCS1* была зарегистрирована в неопыленных завязях линии ЗМСП (7 ДППР) и в опыленных завязях у линии КМ (7 ДПО).

Таким образом, гаплоиндуцирующая линия ЗМСП достоверно отличалась по экспрессии *HAP2/GCS1* в пыльце и завязях только от одной контрольной линии КМ – в 2.7 раза больше в завязях (7 ДПО) и в 5 и 4 раза соответственно меньше в пыльце и в завязях (7 ДПО), и не отличалась в пыльце и завязях 7 ДППР от другой контрольной линии ГПЛ-1. То есть у ЗМСП нет однозначной связи между экспрессией гена *HAP2/GCS1* и индукцией гаплоидов.

В 2017 г. мы впервые секвенировали консервативную (1467 нп) область гена *HAP2/GCS1* линий кукурузы ЗМСП и ГПЛ-1 [25]. В базе данных GenBank в 2020 г. для гена *HAP2/GCS1* кукурузы методом компьютерного прогнозирования предсказано шесть транскриптов. Было установлено, что последовательность гена *HAP2/GCS1*, секвенированная нами для линий КМ и ЗМСП, соответствует транскрипту NM_001320812.1 референсной линии В73, кодирующему белок NP_001307741.1 (Protein HAPLESS 2 isoform 1 precursor). У линии КМ выявлены два несовпадения нуклеотидных последовательностей в позициях 1412, 1626 нп по сравнению с референсной линией В73.

Белок *HAP2/GCS1* имеет домен, называемый фактором слияния мужских гамет, который является высококонсервативным и присутствует в различных семействах растений и животных [48]. Предполагается, что слияние мембран гамет цветковых растений происходит с помощью амфифильной спирали белка *HAP2/GCS1* [49]. Белок *HAP2/GCS1* у линии кукурузы ЗМСП имеет только одну аминокислотную замену по сравнению с линиями КМ и В73 (рис. 2).

Таким образом, установлено, что гены *GEX2*, *HAP2/GCS1* экспрессируются не только в спермиях, но и в женских генеративных структурах кукурузы, однако гаплоиндуцирующая способность кукурузы не коррелирует с их экспрессией. Установлено, что гены *GEX2* гаплоиндуцирующей линии ЗМСП и негаплоиндуцирующей линии КМ имеют 29 и 34 изменений нуклеотидных последовательностей соответственно, в том числе одинаковую вставку размером девять нуклеотидов, по сравнению с референсной линией В73. Анализ аминокислотной последовательности белка *GEX2* гаплоиндуцирующей линии ЗМСП выявил 15 аминокислотных замен по сравнению с линией КМ и 10

аминокислотных замен по сравнению с референсной линией (рис. 2), что, возможно, оказывает воздействие на процесс взаимодействия мембран гамет. Для уточнения роли генов *GEX2* и *HAP2/GCS1* в явлении гаплоиндукции у кукурузы требуется исследование их функций в биологических экспериментах, в том числе CRISPR/Cas-редактирование этих генов, а также анализ трехмерных моделей белков *GEX2* и *HAP2/GCS1* из различных линий кукурузы и возможного влияния нуклеотидных и аминокислотных замен на конформацию и функцию белков.

Авторы признательны О.И. Юдаковой за прочтение рукописи и полезные замечания, а также В.В. Фадееву за помощь в оформлении рукописи и рецензенту за полезные замечания.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 20-016-00020а и 20-316-80020/20 мол-э), гранта Президента РФ (№ МК-4527.2022.1.4, Минобрнауки) и Программы фундаментальных исследований Государственных академий наук на 2021–2023 годы (№ 121031700141-7).

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. Навашин С.Г. Избранные труды. Т. 1. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1951. 364 с.
2. Dresselhaus T., Snell W.J. Fertilization: A sticky sperm protein in plants // *Current Biol.* 2014. V. 24. № 4. P. R164–R166. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.12.044>
3. Coe E.H. A line of maize with high haploid frequency // *The Am. Naturalist.* 1959. V. 93. № 873. P. 381–382. <https://doi.org/10.1086/282098>
4. Chase S.S. Monoploid frequencies in a commercial double cross hybrid maize, and in its component single cross hybrids and inbred lines // *Genetics.* 1949. V. 34. № 3. P. 328–332. <https://doi.org/10.1093/genetics/34.3.328>
5. Тырнов В.С., Завалишина А.Н. Индукция высокой частоты возникновения матроклонных гаплоидов кукурузы // *Докл. АН СССР.* 1984. Т. 276. № 3. С. 735–738.
6. Shatskaya O.A., Zabirowa E.R., Shcherbak V.S., Chumak M.V. Mass induction of maternal haploids in corn // *Maize Genet. Cooperation Newsletter.* 1994. V. 68. P. 51.
7. Bylich V.G., Chalyk S.T. Existence of pollen grains with a pair of morphologically different sperm nuclei as a possible cause of the haploid-inducing capacity in ZMS line // *Maize Genet. Cooperation Newsletter.* 1996. V. 70. P. 33.

8. Chalyk S., Baumann A., Daniel G., Eder J. Aneuploidy as a possible cause of haploid-induction in maize // *Maize Genet. Cooperation Newsletter*. 2003. V. 77. P. 29.
9. Hu H.L., Schrag T.A., Peis R. et al. The genetic basis of haploid induction in maize identified with a novel genome-wide association method // *Genetics*. 2016. V. 202. № 4. P. 1267–1276. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.184234>
10. Чумаков М.И., Мазиллов С.И. Генетический контроль гиногенеза у кукурузы (обзор) // *Генетика*. 2022. Т. 58. № 4. С. 388–397.
11. Еналеева Н.Х., Тырнов В.С., Селиванова Л.П. Оди-нарное оплодотворение и проблема гаплоиндук-ции у кукурузы // *Докл. АН СССР*. 1997. Т. 353. № 3. С. 405–407.
12. Гуторова О.В. Исследование женского гаметофита линии-гаплоиндуктора кукурузы ЗМС-П // *Бюл. Ботанического сада Саратовского гос. ун-та*. 2006. № 5. С. 304–307.
13. Колесова А.Ю., Гуторова О.В. Цитоэмбриологи-ческое исследование гаплоиндуцирующей линии ку-курузы ЗМС-8 // *Бюл. Ботанического сада Сара-товского гос. ун-та*. 2008. № 7. С. 202–205.
14. Тырнов В.С., Еналеева Н.Х. Автономное развитие за-родыша и эндосперма у кукурузы // *Докл. АН СССР*. 1983. Т. 272. № 3. С. 722–725.
15. Enaleeva N.Kh., Tyrnov V.S. Cytological investigation of apomixis in AT-1 plants of corn // *Maize Genet. Co-operation. Newsletter*. 1997. V. 71. P. 74–75.
16. Еналеева Н.Х., Отыкало О.В., Тырнов В.С. Феноти-пическое проявление мутации *ig* в мегагаметофите кукурузы линии Зародышевый маркер // *Генети-ка*. 1998. Т. 34. № 2. С. 259–265.
17. Kelliher T., Starr D., Richbourg L. et al. MATRILINEAL, a sperm-specific phospholipase, triggers maize haploid induction // *Nature*. 2017. V. 542. № 7639. P. 105–109. <https://doi.org/10.1038/nature20827>
18. Gilles L.M., Khaled A. Loss of pollen-specific phospholi-pace NOT LIKE DAD triggers gynogenesis in maize // *EMBO J*. 2017. V. 36. № 6. P. 707–717. <https://doi.org/10.15252/embj.201796603>
19. Liu C., Li X., Meng D., Zhong Y. et al. A 4-bp insertion at ZmPLA1 encoding a putative phospholipase a gener-ates haploid induction in maize // *Mol. Plant*. 2017. V. 10. № 3. P. 520–522. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.01.011>
20. Чумаков М.И. Матроклинная гаплоидия и взаимо-действие гамет у кукурузы // *Генетика*. 2018. Т. 54. № 10. С. 1120–1124.
21. Mori H., Kuroiwa T., Kranz E., Scholten S. GENERA-TIVE CELL SPECIFIC 1 is essential for angiosperm fertilization // *Nat. Cell Biol*. 2006. V. 8. P. 64–71. <https://doi.org/10.1038/ncb1345>
22. Besser V.K., Frank A.C., Johnson M.A., Preuss D. *Arabidopsis* HAP2 (GCS1) is a sperm-specific gene required for pollen tube guidance and fertilization // *Develop-ment*. 2006. V. 133. № 23. P. 4761–4769. <https://doi.org/10.1242/dev.02683>
23. Mori T., Igawa T., Tamiya G. et al. Gamete attachment re-quires GEX2 for successful fertilization in *Arabidopsis* // *Current Biol*. 2014. V. 24. № 2. P. 170–175. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.11.030>
24. Wong J.L., Leydon A.R., Johnson M.A. HAP2(GCS1)-dependent gamete fusion requires a positively charged car-boxy-terminal domain // *PLoS Genetics*. 2010. V. 6. № 3. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000882>
25. Волохина И.В., Моисеева Е.М., Гусев Ю.С. и др. Ана-лиз генов, контролирующих процесс слияния гамет, у гаплоиндуцирующей линии кукурузы ЗМС-П // *Онтогенез*. 2017. Т. 48. № 2. С. 134–139.
26. Hoopes G.M., Hamilton J.P., Wood J.C. et al. An updat-ed gene atlas for maize reveals organ-specific and stress-induced genes // *The Plant J*. 2019. V. 97. № 6. P. 1154–1167. <https://doi.org/10.1111/tpj.14184>
27. Stelpflug S.C., Sekhon R.S., Vaillancourt B. et al. An ex-panded maize gene expression atlas based on RNA se-quencing and its use to explore root development // *The Plant Genome*. 2016. V. 9. № 1. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2015.04.0025>
28. Engel M.L., Holmes-Davis R., McCormick S. Green sperm. Identification of male gamete promoters in *Arabi-dopsis* // *Plant Physiol*. 2005. V. 138. № 4. P. 2124–2133. <https://doi.org/10.1104/pp.104.054213>
29. Ravi M., Chan S.W.L. Haploid plants produced by cen-tromere-mediated genome elimination // *Nature*. 2010. V. 464. № 7288. P. 615–618.
30. Zhang Z., Qiu F., Liu Y. et al. Chromosome elimination and *in vivo* haploid production induced by Stock 6-de-rived inducer line in maize (*Zea mays* L.) // *Plant Cell Reports*. 2008. V. 27. № 12. P. 1851–1860. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0601-2>
31. Qiu F., Liang Y., Li Y. et al. Morphological, cellular and molecular evidences of chromosome random elimina-tion *in vivo* upon haploid induction in maize // *Current Plant Biol*. 2014. V. 1. P. 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2014.04.001>
32. Kelliher T., Starr D., Wang W. et al. Maternal haploids are preferentially induced by CENH3-tailswap trans-genic complementation in maize // *Frontiers Plant Sci*. 2016. V. 7. P. 414. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00414>
33. Xu X., Li L., Dong X. et al. Gametophytic and zygotic selection leads to segregation distortion through *in vivo* induction of a maternal haploid in maize // *J. Exper-imental Bot*. 2013. V. 64. № 4. P. 1083–1096. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers393>
34. Takahashi T., Mori T., Ueda K. et al. The male gamete membrane protein DMP9/DAU2 is required for dou-ble fertilization in flowering plants // *Development*. 2018. V. 145. № 23. dev170076. <https://doi.org/10.1242/dev.170076>
35. Cyprys P., Lindemeier M., Sprunck S. Gamete fusion is facilitated by two sperm cell-expressed DUF679 mem-brane proteins // *Nat. Plants*. 2019. V. 5. P. 253–257. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0382-3>
36. Zhong Y., Liu C., Qi X. et al. Mutation of ZmDMP en-hances haploid induction in maize // *Nat. Plants*. 2019. V. 5. P. 575–580. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0443-7>
37. Conner J.A., Mookkan M., Huo H. et al. A parthenogen-esis gene of apomict origin elicits embryo formation from unfertilized eggs in a sexual plant // *Proc. Natl*

- Acad. Sci. USA. 2015. V. 112. № 36. P. 11205–11210.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1505856112>
38. Conner J.A., Podio M., Ozias-Akins P. Haploid embryo production in rice and maize induced by PsASGR-BBML transgenes // *Plant Reproduction*. 2017. V. 30. P. 41–52.
 39. Zavalishina A.N., Tyrnov V.S. Induction of matroclinal haploidy in maize *in vivo* // *Reproductive Biol. Plant Breeding: XIII EUCARPIA Congr.* 1992. P. 221–222.
 40. Гуторова О.В., Апанасова Н.В., Юдакова О.И. Создание генетически маркированных линий кукурузы с наследуемым и индуцированным типами партеногенеза // *Изв. Самарского науч. центра РАН*. 2016. Т. 18. № 2-2. С. 341–344.
 41. Chase S.S. Monoploids and monoploid-derivatives of maize (*Zea mays* L.) // *The Bot. Review*. 1969. V. 35. № 2. P. 117–168.
 42. Bijli K.M., Singh B.P., Sridhara S., Arora N. Isolation of total RNA from pollens // *Preparative Biochem. Biotechnol.* 2001. V. 31. № 2. P. 155–162.
<https://doi.org/10.1081/PB-100103381>
 43. Manoli A., Sturaro A., Trevisan S. *et al.* Evaluation of candidate reference genes for qPCR in maize // *J. Plant Physiol.* 2012. V. 169. № 8. P. 807–815.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.01.019>
 44. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method // *Methods*. 2001. V. 25. № 4. P. 402–408.
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
 45. Weaver S., Dube S., Mir A. *et al.* Taking qPCR to a higher level: analysis of *cnv* reveals the power of high throughput qPCR to enhance quantitative resolution // *Methods*. 2010. V. 50. № 4. P. 271–276.
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.003>
 46. Alandete-Saez M., Ron M., McCormick S. GEX3 expressed in the male gametophyte and in the egg cell of *Arabidopsis* is essential for micropylar pollen tube guidance and plays a role during early embryogenesis // *Mol. Plant*. 2008. V. 1. № 4. P. 586–598.
<https://doi.org/10.1093/mp/ssn015>
 47. Borges F., Gomes G., Gardner R. *et al.* Comparative transcriptomics of *Arabidopsis* sperm cells // *Plant Physiol.* 2008. V. 148. № 2. P. 1168–1181.
<https://doi.org/10.1104/pp.108.125229>
 48. Valansi C., Moi D., Leikina E. *et al.* *Arabidopsis* HAP2/GCS1 is a gamete fusion protein homologous to somatic and viral fusogens // *J. Cell Biol.* 2017. V. 216. P. 571–581.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201610093>
 49. Fedry J., Forcina J., Legrand P. *et al.* Evolutionary diversification of the HAP2 membrane insertion motifs to drive gamete fusion across eukaryotes // *PLoS Biology*. 2018. V. 16(8): e2006357.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006357>

Comparative Analysis of the *HAP2/GCS1*, *GEX2* Genes Expression in Maize Lines of Saratov Selection

E. M. Moiseeva^a, Yu. S. Gusev^{a, b}, O. V. Gutorova^b, and M. I. Chumakov^{a, *}

^a*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms – Subdivision of the Federal Research Center, Saratov Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, Saratov, 410049 Russia*

^b*Chernyshevsky Saratov National Research State University, Saratov, 410012 Russia*

*e-mail: chumakov_m@ibppm.ru

The haploid-induction phenomenon have a scientific and practical aspects for development the effective haploid-inducing maize line and diploid homozygous lines creation. The article discusses the relationship between the maize haploid-induction and the violation of the gamete interactions, in particular for *GEX2-HAP2/GCS1*-mediated adhesion and fusion of gamete membranes in Zarodishevii Marker Saratovskii Purpurnii (ZMSP) maize lines. Using real-time RT-PCR method, it was found that the *GEX2*, *HAP2/GCS1* genes are expressed in sperm and ovules, but the maize haploid-inducing ability does not correlate with their expression. It was shown that the ZMSP haploid-inducing line have 27 SNP, one 9-bp insertion, 2-bp SNP and the corresponding 10 amino acid substitutions with two insertions in the GEX2 protein in comparing with reference B73 line. It was found that HAP2/GCS1, as a conservative protein for membrane fusion has only one amino acid substitution in ZMSP in comparing with B73 maize and Brown Marker maize lines.

Keywords: maize, *Zea mays*, gynogenesis genes, expression.

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ *ADSY8* И *RYR3* ДЛЯ УСТАНОВЛЕНИЯ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ К ДИКИМ ИЛИ ДОМАШНИМ ПРЕДСТАВИТЕЛЯМ ВИДА *Canis lupus*¹

© 2023 г. В. Н. Кипень^{1, *}, М. М. Патрин², Е. В. Снытков^{1, 3}, А. Н. Верчук^{1, 4}, А. Н. Семак⁵

¹Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, 220072 Республика Беларусь

²ООО “Максим Медикал”, Москва, 123423 Россия

³Международный государственный экологический институт им. А.Д. Сахарова, Белорусский государственный университет, Минск, 220070 Республика Беларусь

⁴Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь, Минск, 220073 Республика Беларусь

⁵ООО “ВэлВет”, Минск, 220063 Республика Беларусь

*e-mail: v.kipen@igc.by

Поступила в редакцию 20.04.2022 г.

После доработки 25.07.2022 г.

Принята к публикации 20.09.2022 г.

На биологическом материале (образцы волка и домашней собаки) подтвержден высокий дифференцирующий потенциал полиморфных вариантов g.27748425T>C (ген *ADSY8*) и g.1414373T>C (ген *RYR3*). Предложена тест-модель из двух полиморфизмов для дифференциации волка и домашней собаки, которая отличается высокими значениями точности (96.2%), специфичности (96.3%) и чувствительности (98.9%). С использованием KASP разработан быстрый и простой подход к дифференциации на основании предложенной тест-модели, который призван сократить временные и финансовые затраты на молекулярно-генетический анализ, а также снизить риск кросс-контаминации, т. к. процесс является одностадийным (исключены этапы рестрикции и электрофореза).

Ключевые слова: *Canis lupus*, *Canis lupus familiaris*, SNP, дифференциация, конкурентная аллель-специфическая ПЦР (KASP, Kompetitive allele specific PCR), ПЦР-ПДРФ, плавление ампликона с высоким разрешением (HRM, high-resolution melting), генотипирование *in silico*.

DOI: 10.31857/S0016675823030062, EDN: IOHKSC

Серый волк (*Canis lupus*) — крупный плотоядный хищник, который является ключевым видом в биоценозе. Однако волки долгое время являлись основным источником конфликта между человеком и хищником, что привело к долгосрочному преследованию волков и как итог — к значительному снижению их численности, генетического разнообразия и потока генов между популяциями. Для эффективной защиты и адаптивного управления популяциями волка необходим научно-обоснованный подход. В мета-обзоре M. Hindrikson с соавт. [1] суммированы результаты генетических исследований популяций волка в Европе, охватывающих основные исследования “предгеомной эры” и первые выводы об “эре геномики” [2, 3]. Именно на основании данных, полученных с

использованием чиповых технологий (анг. Microarray analysis), в научных работах последних лет появляется огромный массив генетической информации (анг. Raw data), доступный для широкого круга исследователей, решающих прикладные задачи. Так, в работе А.Е. Гребенчук обсуждалась необходимость в дифференциации с использованием молекулярно-генетических методов представителей вида *Canis lupus*, в частности — волка и собаки [4]. Также в работе Е.Э. Хейдоровой с соавт. была показана необходимость дальнейшего изучения генетического разнообразия *Canis lupus* на основе ядерного генома для объяснения нетипичных для волка морфологических особенностей, которые могут быть следствием гибридизации с домашними собаками [5].

С учетом современного состояния геномных данных для вида *Canis lupus*, представленных в открытом доступе (Sequence Read Archive, SRA — www.ncbi.nlm.nih.gov/sra), а также учитывая воз-

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0016675823030062 для авторизованных пользователей.

возможности ряда биоинформатических алгоритмов для множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей и поиска вариаций, представляется целесообразным разработать тест-систему на основании анализа SNP (англ. Single nucleotide polymorphism) для дифференциации собаки (*Canis lupus familiaris*) и волка (*Canis lupus*).

В следующих работах была показана возможность использования данных NGS-проектов для поиска генетических маркеров, в первую очередь — SNP, обладающих высоким дифференцирующим потенциалом для различения особей в пределах биологического вида [6–8].

Мы полагаем, что использование алгоритма для дифференциации волка и домашней собаки, основанного на расчетах частоты встречаемости аллелей в STR-локусах, должно быть проверено в пределах конкретного географического региона, что при свободной миграции волка с территории сопредельных стран (например, в Российскую Федерацию из Республики Беларусь и Украины) усложняет такой подход ввиду необходимости изучения частотного разнообразия и на этих прилегающих территориях. Ввиду данного факта поиск SNP с высоким дифференцирующим потенциалом имеет важное значение и является актуальной задачей. По причине отсутствия адаптивного управления к численности волка и его массового отстрела будут наблюдаться волны значительной депопуляции, чередующиеся с быстрым увеличением численности за счет миграции представителей вида. По этой причине оценка частотного разнообразия аллелей ряда STR-локусов будет требовать постоянной актуализации, что может быть трудновыполнимо. Как итог, будет происходить изменение частотного распределения и потеря, в первую очередь, редких аллелей. Данный факт отразится на точности алгоритма дифференциации волка и домашней собаки. Однако данного недостатка лишен подход, основанный на анализе SNP, т. к. более чем в 95% случаев для них показано только две альтернативные аллельные формы.

Таким образом, цель данного исследования — с использованием методов биоинформатики выявить SNP с высоким дифференцирующим потенциалом для установления принадлежности биологических образцов к диким или домашним представителям вида *Canis lupus*, и на основании проведенного анализа предложить тест-систему из нескольких SNP для дифференциации собаки (*Canis lupus familiaris*) и волка (*Canis lupus*).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биологические образцы. В исследование были включены следующие группы: образцы биологического материала (кровь) домашней собаки общей численностью 118 шт.; образцы биологического ма-

териала (кровь или мышечная ткань) волка — 80 шт. Образцы домашних животных были отобраны сотрудниками ветеринарных клиник и поступали для молекулярно-генетического анализа в отдельных пробирках типа Vacutainer (BD Vacutainer® Sodium Citrate Tubes), снабженных бирками с описанием животного (породная принадлежность, возраст, пол). Образцы биологического материала волка предоставлялись охотниками, добывающими волков в рамках программ регулирования численности в результате личных контактов авторов данной работы.

Выделение ДНК. ДНК из образцов мышечной ткани выделяли с использованием методики, основанной на высвобождении ДНК в ходе инкубирования образцов биологического материала в лизирующем буфере, содержащем 2% додецилсульфата натрия (SDS), 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 20 mM EDTA (pH 8.0) и протеиназу К. При наличии фрагментов, которые подверглись лизису не полностью, осадок отделяли центрифугированием в течение 5 мин при 3000 об./мин, а супернатант переносили в новую пробирку. К супернатанту добавили 6.3 M раствор гуанидинхлорида в объеме 1/2 от объема исходной смеси, далее помешали пробирки в холодильник при 0–5°C на 10–15 мин, осадок комплекса продуктов расщепления белков с SDS удаляли центрифугированием в течение 8 мин (5000 об./мин). Далее использовали коммерческую смесь Roti®-Phenol (www.carlroth.com) согласно рекомендациям производителя.

Для выделения ДНК из крови использовали коммерческие наборы “Blood-Animal-Plant DNA Preparation Kit” (Jena Bioscience, www.jenabioscience.com).

Концентрацию ДНК измеряли с использованием спектрофотометра NanoDrop-1000 (Pqlab, Германия). Среднее значение концентрации ДНК составило 85.4 ± 11.8 нг/мкл ($260/280 = 1.92 \pm 0.13$).

KASP. Определение генотипа по SNP g.27748425T>C (*ADCY8*) и g.1414373T>C (*RYR3*) осуществляли с использованием технологии, основанной на конкурентной аллель-специфической ПЦР (KASP, Kompetitive allele specific PCR). Генотипирование проводили с использованием KASP Assay mix (KASP by Design, KBD) и KASP Master mix (LGC Biosearch Technologies, Великобритания; ООО “Максим Медикал”, РФ) в двукратной повторности. ПЦР проводили в объеме 10 мкл в термоциклире CFX96 (Bio-Rad, США) согласно имеющимся рекомендациям по KASP.

ПЦР-ПДРФ. Реакцию ПЦР для генотипирования по SNP g.27748425T>C (*ADCY8*) и g.1414373T>C (*RYR3*) проводили в объеме 20 мкл. Количество вносимой ДНК на реакцию составляло 10–20 нг. Для ПЦР использовали реакционную смесь qPCRMix-HS (Евроген, РФ), финальная концентрация прямого и обратного праймеров со-

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидов для анализируемых в рамках данного исследования полиморфных вариантов с использованием ПЦР-ПДРФ и HRM

Полиморфизм (ген)	Последовательность олигонуклеотида 5' > 3'	Генотип/размер фрагментов (пн)
*g.27748425T>C (<i>ADCY8</i>)	F: 5'-GGG TTT GAA TAC TTC TCC CCA AC-3' R: 5'-AAT GAC ATA ACC ACA TCC CCC AAT-3'	T/T (31/45) C/T (31/45/76) C/C (76)
**g.1414373T>C (<i>RYR3</i>)	F: 5'-TGA TGA GGT GAC ACG GAT CTC-3' R: 5'-CAG GCC TTC CCT TAG AAG TTA C-3'	T/T (71) C/T (25/46/71) C/C (25/46)

* CanFam3.1 (GCF_000002285.3), Chromosome 13 (NC_006595.3).

** CanFam3.1 (GCF_000002285.3), Chromosome 30 (NC_051834.1).

ставила 400 нМ. Протокол амплификации для двух SNP был одинаков: 95°C – 5 мин, 40 циклов (95°C – 10 с, 56°C – 30 с, 72°C – 30 с), 72°C – 5 мин. Реакцию рестрикции проводили согласно рекомендациям производителей, для g.27748425T>C использовали *TaI*I, для g.1414373T>C – *TaqI* (Thermo Fisher Scientific). Электрофорез проводили в 10.0%-ном ПААГ (акриламид/бисакриламид – 29/1, м/м) при постоянном напряжении электрического поля 320 В в течение 80 мин в термостатируемых условиях – +(6–10)°C.

Информация о последовательностях олигонуклеотидов (Евроген, РФ) для анализируемых SNP, а также о фрагментах реакции рестрикции представлены в табл. 1.

HRM-анализ. Генотипирование по SNP g.27748425T>C (*ADCY8*) и g.1414373T>C (*RYR3*) также проводилось с использованием Precision Melt Supermix for High Resolution Melt (HRM) Analysis (Bio-Rad, США) в трехкратной повторности согласно рекомендации производителя. Результаты аллельной кластеризации были проанализированы с использованием Precision Melt Analysis™ Software v1.3 (Bio-Rad, США). Концентрация ДНК для всех образцов была стандартизирована до 10 нг/мкл. Протокол амплификации и плавления ампликона соответствовал рекомендуемому Bio-Rad.

Определение генотипа *in silico*. Генотипы *in silico* для животных, геномы которых были представлены в открытом доступе в NCBI, определяли с использованием on-line алгоритма SRA-Blast (файлы в формате *.sam) и программы Unipro UGENE v.1.31.1 [9]. Определение генотипа с использованием алгоритма BLAST (с покрытием в интересующем полиморфизме ≥5х) было проведено для 694 особей домашней собаки (*Canis lupus familiaris*) и 203 особей волка (*Canis lupus*). Для автоматизации процесса поиска, скачивания файлов в формате *.sam, а также пакетного определения генотипа для первичного анализа использовали программную библиотеку Selenium WebDriver для Google Chrome (версия 89.0.4389.90) под управлением Python (версия 3.9).

Также определены генотипы для ряда родственных биологических видов: обыкновенный шакал – *Canis aureus* (*n* = 1), койот – *Canis latrans* (*n* = 5), гималайский волк – *Canis lupus chanco* (*n* = 8), Динго – *Canis lupus dingo* (*n* = 10), иберийский волк – *Canis lupus signatus* (*n* = 1), красный волк – *Cuon alpinus* (*n* = 2), африканский золотой волк – *Canis lupaster* (*n* = 1), эфиопский шакал – *Canis simensis* (*n* = 1), гиеновидная собака – *Lycaon pictus* (*n* = 1). Дополнительно определены генотипы для трех особей, являющихся гибридами между волком и собакой (*Canis lupus* × *Canis lupus familiaris* – wolfdog).

При анализе “сырых” данных (raw data) полных геномов использовали файлы из проектов PRJEB34110, PRJEB39198, PRJEB42199, PRJEB43408, PRJEB44869, PRJNA263947, PRJNA358192, PRJNA417738, PRJNA448733, PRJNA494719, PRJNA494815, PRJNA512209, PRJNA517114, PRJNA532581, PRJNA543877, PRJNA593363, PRJNA648123.

Используемые настройки поиска генотипа *in silico* отражены в работе [10].

Статистический анализ данных. Дифференцирующий потенциал SNP определяли с использованием ROC-анализа в SPSS v.20.0. При наличии нижней границы асимптотического 95%-го доверительного интервала более 0.8 для параметра AUC (площадь под кривой) полиморфизм позиционировался как генетический маркер с высоким дифференцирующим потенциалом.

Комплексную оценку дифференцирующего потенциала для совокупности SNP проводили с использованием программы MDR v.3.0.2 (<http://www.multifactorialdimensionalityreduction.org/>) [11]. Вклад конкретного генотипа определялся величиной энтропии *H* (выраженной в %). При *H* = 100% генотип способен однозначно дифференцировать, к какой группе (волк или домашняя собака) относится неизвестный образец. В программе MDR в результате множественных перестановок (пермутаций) первичных данных определяется наиболее оптимальная модель дифференциации.

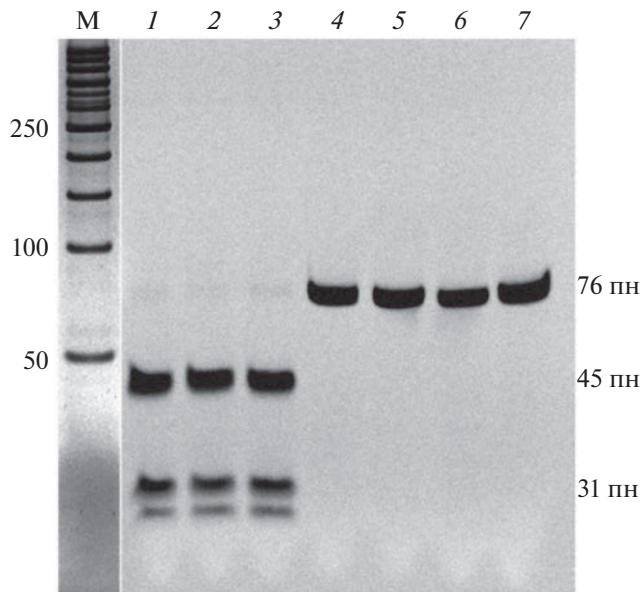


Рис. 1. Результаты электрофоретического разделения рестриктов для полиморфизма g.27748425T>C гена *ADCY8* в 10.0%-ном ПААГ. М – маркер молекулярного веса (Jena Bioscience M-213S). 1 – T/T *Canis lupus f.*, 2 – T/T *Canis lupus f.*, 3 – T/T *Canis lupus f.*, 4 – C/C *Canis lupus*, 5 – C/C *Canis lupus*, 6 – C/C *Canis lupus*, 7 – C/C *Canis lupus*.

В процессе моделирования были использованы высоко консервативные настройки поиска конфигурации модели, которые позволили однозначно дифференцировать наличие/отсутствие статистически значимых эффектов, а имеено: количество атрибутов (attribute count range) – от 1 до n (где n – число переменных в модели); воспроизводимость модели (cross-validation count) – 100; анализ топ-моделей (track top models) – 1000; поиск конфигурации модели (search method configuration) – всесторонний (exhaustive); метод сравнения (ambiguous cell analysis) – точный тест Фишера (Fisher's exact test); классификация ячеек (ambiguous cell assignment) – неклассифицированные (unclassified). Корректность модели оценивали по значению сбалансированной точности (Balanced Accuracy), которая зависит от чувствительности и специфичности модели.

Вероятность отнесения образца к одной из двух групп: *Canis lupus familiaris* или *Canis lupus*, – рассчитывали в SPSS v.20.0 с использованием логистической регрессии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С использованием алгоритма глобального выравнивания, реализованного в ПО Unipro UGENE v.1.31.1 [9], были проанализированы на наличие SNP с высоким дифференцирующим потенциалом (т. е. с максимально различающимися частота-

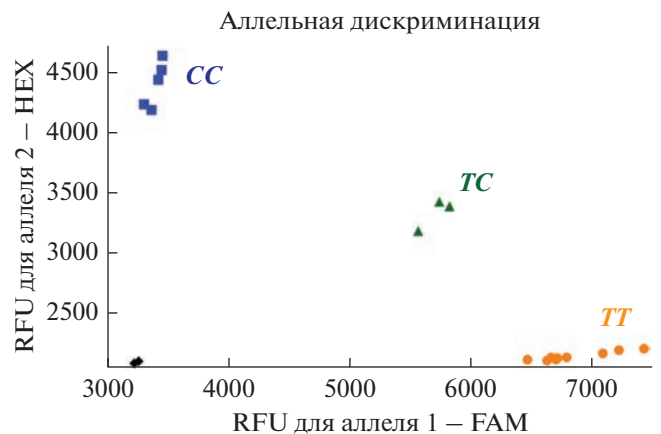


Рис. 2. График аллельной дискриминации результатов KASP для полиморфизма g.27748425T>C гена *ADCY8*.

ми распространения аллелей для двух групп) следующие регионы: на 13 хромосоме – g.27000000–g.29000000 и на 30 хромосоме – g.800000–g.1600000. Выбор данных регионов был обусловлен тем фактом, что в исследовании В.М. Vonholdt с соавт. [3] с применением полногеномного анализа SNP были выявлены кластеры нуклеотидных последовательностей (для 13 хромосомы – длиной 543841 пн, для 30 хромосомы – 1239195 пн), содержащие SNP, частота аллелей для которых существенно отличалась для представителей *Canis lupus familiaris* и *Canis lupus* по причине эволюционной дивергенции. В результате биоинформатического анализа были выявлены 13 SNP с потенциально высоким дифференцирующим потенциалом.

С использованием биоинформатического и молекулярно-генетического анализа определены генотипы по SNP g.27748425T>C (*ADCY8*) и g.1414373T>C (*RYR3*) для 1095 животных, из них 283 – *Canis lupus*, 812 – *Canis lupus familiaris* (см. Приложение). Наибольший дифференцирующий потенциал был определен для SNP g.27748425T>C (ген *ADCY8*) – AUC = 0.947, 95%ДИ 0.934–0.960, $p = 3.45E-112$. Для SNP g.1414373T>C (ген *RYR3*) – AUC = 0.893, 95%ДИ 0.871–0.915, $p = 4.31E-87$.

Для включенных в исследование образцов домашней собаки ($n = 812$) показано наличие трех генотипов для полиморфизма g.27748425T>C (*ADCY8*), при этом аллель T распространен в выборке “Домашняя собака” с частотой 78.9%, т. е. является мажорным. Для образцов из выборки “Волк” ($n = 283$) в рамках данного исследования аллель C распространен с частотой 99.3%. Электрофореграмма разделения рестриктов представлена на рис. 1, результаты аллельной дискриминации с использованием KASP – на рис. 2.

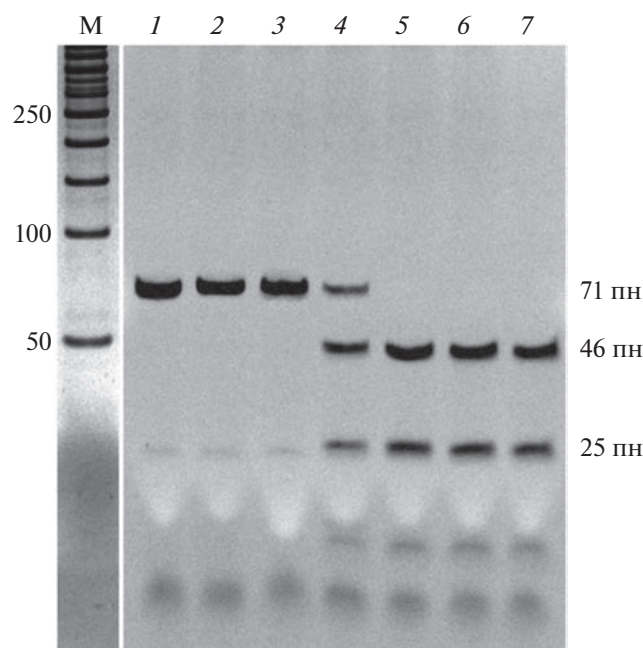


Рис. 3. Результаты электрофоретического разделения рестриков для полиморфизма g.1414373T>C гена *RYR3* в 10.0%-ном ПААГ. М – маркер молекулярного веса (Jena Bioscience M-213S). 1 – T/T *Canis lupus f.*, 2 – T/T *Canis lupus f.*, 3 – T/T *Canis lupus f.*, 4 – C/T *Canis lupus*, 5 – C/C *Canis lupus*, 6 – C/C *Canis lupus*, 7 – C/C *Canis lupus*.

Для образцов из выборки “Домашняя собака” для полиморфизма g.1414373T>C (*RYR3*) также показано наличие трех генотипов. Аллель T распространен в данной выборке с частотой 80.9%. Для образцов из выборки “Волк” в рамках данного исследования аллель C распространен с частотой 83.2%. Электрофореграмма разделения рестриков представлена на рис. 3, результаты аллельной дискриминации с использованием KASP – на рис. 4.

Для создания универсальной системы дифференциации было принято решение включить в тест-систему по одному SNP из каждой хромосомы, чтобы избежать сложностей, сопряженных с совместным наследованием генетических маркеров. Графическая интерпретация модели представлена на рис. 5. Согласно полученным результатам сбалансированная точность дифференциации (adj. Balanced accuracy) волка от домашней собаки при анализе 1095 образцов по двум SNP – g.27748425T>C (ген *ADCY8*, chr. 13) и g.1414373T>C (ген *RYR3*, chr. 30), – составила 96.2% (специфичность модели – 96.3, чувствительность – 98.9%), см. файл “Доп. материалы.xlsx”, лист “MDR_result”. В среднем, в 5.8% случаев особь не удалось отнести ни к одному кластеру с заявленным в MDR-уровнем точности в 99.0%.

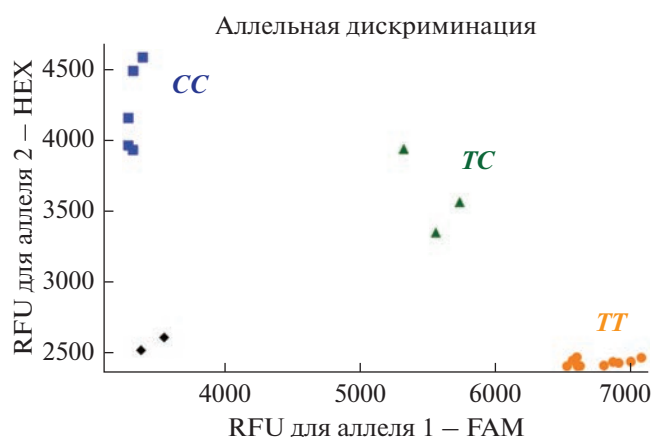


Рис. 4. График аллельной дискриминации результатов KASP для полиморфизма g.1414373T>C гена *RYR3*.

В то же время при оценке точности отнесения образца к одной из двух групп: *Canis lupus familiaris* (CLF) или *Canis lupus* (CL) с использованием логистической регрессии получены следующие данные (см. файл “Доп. материалы.xlsx”, лист “LOG”): при наличии генотипа CC (*ADCY8*)/CC (*RYR3*) вероятность отнесения образца к группе CL составляет 95.26% (распространенность особей с данным генотипом в группе – 71.73%), при наличии генотипа CC (*ADCY8*)/TC (*RYR3*) – 72.93% (распространенность – 22.26%); при наличии генотипа TC (*ADCY8*)/CC (*RYR3*) вероятность отнесения образца к группе CLF составляет 80.27%, при наличии генотипа TC (*ADCY8*)/TC (*RYR3*) – 96.81%, при наличии генотипа TC (*ADCY8*)/TT (*RYR3*) – 99.56%, при наличии генотипа TT (*ADCY8*)/CC (*RYR3*) – 99.70%, при наличии генотипа TT (*ADCY8*)/TC (*RYR3*) – 99.96%, при наличии генотипа TT (*ADCY8*)/TT (*RYR3*) – 100%.

Особого внимания заслуживают три особи волка, по фенотипическим характеристикам однозначно относящихся к *Canis lupus*, с генотипами TC (*ADCY8*)/TC (*RYR3*) и TT (*ADCY8*)/TT (*RYR3*), которые теоретически могут относиться к волкосомам (гибридам между волком и собакой). Косвенно это указывает тот факт, что для образцов SAMEA7038723, SAMEA7038724 и SAMEA7038725, являющихся гибридами между волком и собакой (*Canis lupus* × *Canis lupus familiaris* – wolfdog, BioProject – PRJEB39198), определены гетерозиготные генотипы для полиморфизма g.27748425T>C (*ADCY8*), см. файл “Доп. материалы.xlsx” (лист “dataset”) и табл. 2. Возможно, в дальнейшем анализ этих образцов с использованием STR-локусов подтвердит данное предположение.

Среди особей *Canis lupus familiaris* с генотипами CC (*ADCY8*)/CC (*RYR3*) и CC (*ADCY8*)/TC (*RYR3*) выявлены породы: русский черный терьер, шар-

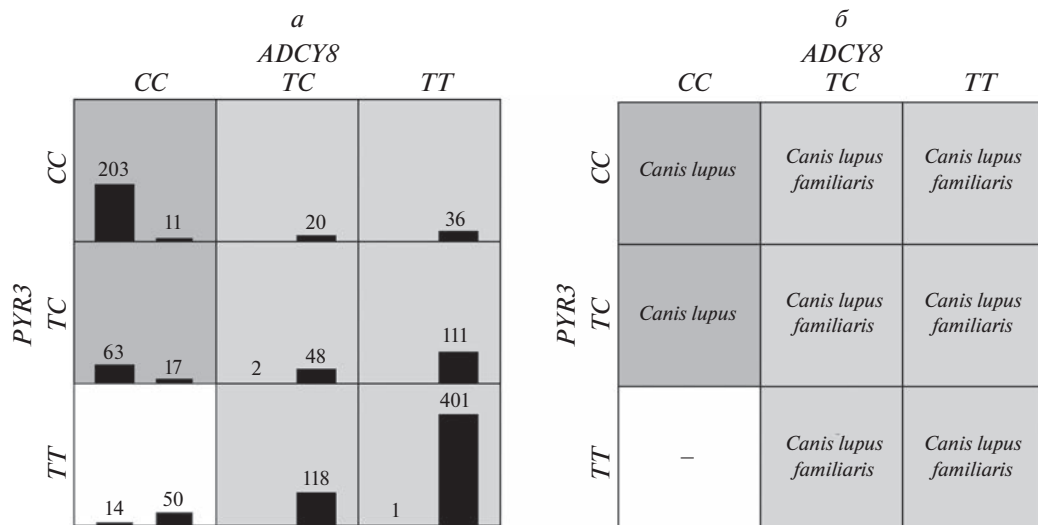


Рис. 5. Графическое представление модели из двух полиморфизмов в генах *ADCY8* и *RYR3*. *a* — распределение генотипов исследованных локусов в выборках “Домашняя собака” и “Волк”: в каждой ячейке цифра слева — абсолютное число особей *Canis lupus*, цифра справа — абсолютное число особей *Canis lupus familiaris*. *б* — результат отнесения образца к одной из двух групп — *Canis lupus* или *Canis lupus familiaris*.

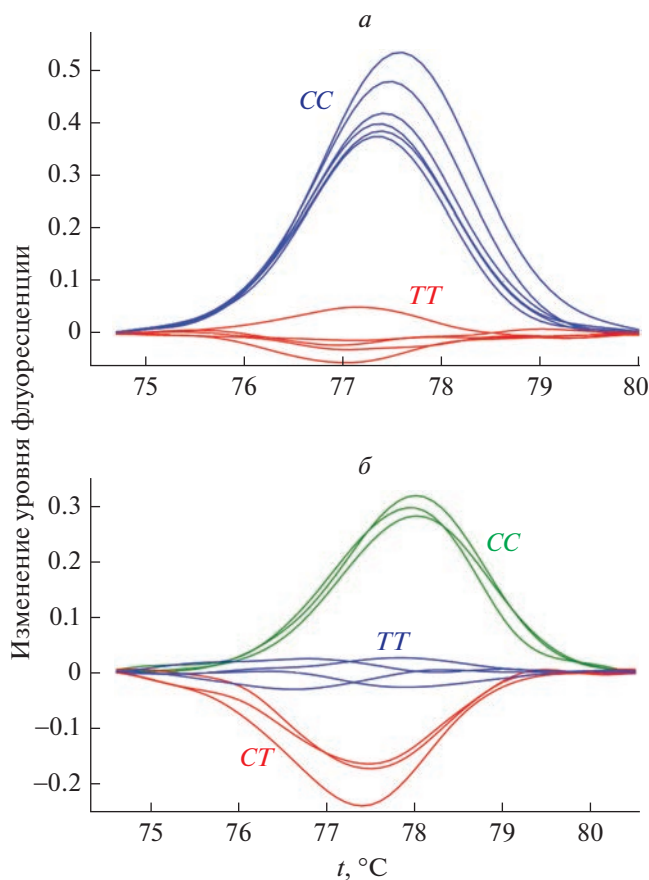


Рис. 6. Результат кластеризации генотипов в Precision Melt Analysis™ Software v.1.3 (Bio-Rad, США) для полиморфизма: *a* — g.27748425T>C (*ADCY8*), *б* — g.1414373T>C (*RYR3*).

пей, аляскинский маламут, пекинес, бельгийская овчарка, куньминская овчарка, такса, бернский зенненхунд, йоркширский терьер, шотландский терьер, алапахский бульдог, доберман пинчер. Таким образом, наличие аллеля С (g.1414373T>C, *RYR3*), характерного для *Canis lupus*, не является специфической характеристикой для каких-то конкретных пород собак.

Также мы апробировали метод HRM для генотипирования полиморфных вариантов g.27748425T>C (*ADCY8*) и g.1414373T>C (*RYR3*). Цель этапа — дать исследователю простой, но достаточно точный и доступный метод генотипирования в контексте описанной выше модели. Для деградированных образцов ДНК, как нам представляется, данный способ будет весьма актуален.

Результаты аллельной кластеризации были подтверждены с использованием ПЦР-ПДРФ и KASP. Результаты кластеризации для полиморфизма g.27748425T>C (*ADCY8*) представлены на рис. 6, *a*, для g.1414373T>C (*RYR3*) — рис. 6, *б*.

Также с использованием предложенной нами тест-системы была проведена апробация на образцах близкородственных к *Canis lupus* видов, а именно: обыкновенный шакал (*Canis aureus*), койот (*Canis latrans*), гималайский волк (*Canis lupus chanco*), динго (*Canis lupus dingo*), иберийский волк (*Canis lupus signatus*), красный волк (*Cuon alpinus*), африканский золотой волк (*Canis lupaster*), эфиопский шакал (*Canis simensis*) и гиеновидная собака (*Lycaon pictus*). Результаты генотипирования in silico и классификация по кластерам представлены в табл. 2. Особи видов *Canis latrans*,

Таблица 2. Генотипы животных из семейства Canidae по двум SNP в генах *ADCY8* и *RYR3*

Образец	Вид	g.27748425T>C (<i>ADCY8</i>)	g.1414373T>C (<i>RYR3</i>)
SAMN10180427*	<i>Canis aureus</i>	TT	CC
SAMN02921301#	<i>Canis latrans</i>	CC	CC
SAMN08005340#		CC	CC
SAMN10180421#		CC	CC
SAMN10180422#		CC	CC
SAMN10180423#		CC	CC
SAMN10199001#	<i>Canis lupaster</i>	CC	CC
SAMN03652997#	<i>Canis lupus chanco</i>	CC	CC
SAMN03652998*		TC	CC
SAMN03652999#		CC	CC
SAMN03653000#		CC	CC
SAMN03653001#		CC	TC
SAMN03653002#		CC	CC
SAMN03653003#		CC	CC
SAMN03653004#		CC	CC
SAMN08873190#	<i>Canis lupus dingo</i>	CC	TC
SAMN13476347*		TT	CC
SAMN13476607*		TC	TC
SAMN13476608#		CC	CC
SAMN13476865#		CC	CC
SAMN13476866*		TC	TC
SAMN13476879#		CC	CC
SAMN13476881*		TT	CC
SAMN13476886#		CC	CC
SAMN13476889#		CC	CC
SAMN04851099#	<i>Canis lupus signatus</i>	CC	CC
SAMN10180425#	<i>Canis simensis</i>	CC	CC
SAMN03168405#	<i>Cuon alpinus</i>	CC	CC
SAMN10180424#		CC	CC
SAMN10180432#	<i>Lycaon pictus</i>	CC	CC
SAMEA7038723*	<i>Canis lupus</i> × <i>Canis lupus familiaris</i> (wolfdog)	TC	CC
SAMEA7038724*		TC	CC
SAMEA7038725*		TC	CC

* — согласно дифференцирующей модели образец определен как “Домашняя собака”, # — согласно дифференцирующей модели образец определен как “Волк”.

Canis lupus signatus, *Canis simensis*, *Cuon alpinus*, *Lycaon pictus* и *Canis lupaster* были отнесены к кластеру “Волк” (*Canis lupus*). Семь из восьми представителей вида *Canis lupus chanco* также были отнесены к кластеру “Волк” (*Canis lupus*). Среди особей вида *Canis lupus dingo* лишь шесть из десяти были отнесены к кластеру “Волк” (*Canis lupus*). Как известно, собаки динго — вторично одичавшие домашние собаки, и, таким образом, среди них высока частота аллелей, характерных для вида *Canis lupus familiaris*.

Необходимо отметить, что сбалансированная точность дифференциации *Canis lupus familiaris* и *Canis lupus* составила более 95%, данного показателя вполне достаточно для решения большинства задач биологической направленности, например, в контексте популяционных исследований. В то же время, в 2.56% случаев (согласно модели, рис. 6) образцы домашней собаки могут быть некорректно дифференцированы как образцы волка. В перспективе для увеличения точности модели (например для криминалистических приложений) необходимо увеличение выборки исследуемых образцов за счет включения новых образцов с заведомо известной видовой принадлежностью, например по результатам биологического исследования (при наличии шкуры и др. объектов биологического происхождения, позволяющих однозначно дифференцировать видовую принадлежность образца) и/или генетического исследования (например анализ STR-локусов). Также перспективно и добавление в предложенную нами модель новых SNP с высоким дифференцирующим потенциалом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках настоящего исследования предложена тест-система, основанная на анализе двух SNP в генах *ADCY8* и *RYR3*, по дифференциации волка (*Canis lupus*) и домашней собаки (*Canis lupus familiaris*). Так, с использованием методов биоинформатики определены SNP с высоким дифференцирующим потенциалом для различения волка и домашней собаки, а также на практическом материале подтвержден высокий дифференцирующий потенциал выявленных полиморфных вариантов. На основании результатов молекулярно-генетического анализа и генотипирования *in silico* 1095 образцов предложена тест-модель из двух SNP — g.27748425T>C (*ADCY8*) и g.1414373T>C (*RYR3*), сбалансированная точность которой составляет не менее 96.2% при специфичности 96.3%. Входящие в тест-систему SNP представляются возможным анализировать с использованием различных технологий — KASP, ПЦР-ПДРФ или HRM.

Предложенная нами схема по дифференциации волка и домашней собаки с использованием двух SNP выгодно отличается своей универсально-

стью (с позиций методологического подхода возможно использовать различную приборную базу), высокими точностью и специфичностью. Молекулярно-генетический анализ с использованием KASP призван сократить временные и финансовые затраты на молекулярно-генетическое тестирование, а также снизить риск кросс-контаминации, т. к. процесс является одностадийным (исключены этапы рестрикции и электрофореза).

В целом, продолжение исследований, расширение базы образцов и включение в тест-систему дополнительных SNP для идентификации, в том числе и гибридов между *Canis lupus familiaris* и *Canis lupus*, продолжает оставаться актуальной задачей.

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке ООО “Максим Медикал” в рамках частной научной инициативы “Analysis of SRA Data using bioinformatics methods”.

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. Hindrikson M., Remm J., Pilot M. et al. Wolf population genetics in Europe: A systematic review, meta-analysis and suggestions for conservation and management // Biol. Rev. 2016. V. 92(3). P. 1601–1629. <https://doi.org/10.1111/brv.12298>
2. Cronin M.A., Canovas A., Bannasch D.L. et al. Single nucleotide polymorphism (SNP) variation of wolves (*Canis lupus*) in Southeast Alaska and comparison with wolves, dogs, and coyotes in North America // J. Hered. 2015. V. 106(1). P. 26–36. <https://doi.org/10.1093/jhered/esu075>
3. Vonholdt B.M., Pollinger J.P., Lohmueller K.E. et al. Genome-wide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication // Nature. 2010. V. 464(7290). P. 898–902. <https://doi.org/10.1038/nature08837>
4. Гребенчук А.Е. Псовые как объект экспертного ДНК-анализа: криминалистические и генетические аспекты // Вопр. криминологии, криминалистики и судебной экспертизы. 2016. № 2 (40). С. 135–140.
5. Хейдорова Е.Э., Шпак А.В., Гомель К.В. и др. Молекулярно-генетическая идентификация инвазивного вида — шакала азиатского (*Canis aureus*) на территории Беларуси // Докл. НАН Беларуси. 2018. Т. 62. № 1. С. 86–92. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2018-62-1-86-92>
6. Купень В.Н., Иванова Е.В., Снытков Е.В., Верчук А.Н. Анализ полиморфизма гена гестина (*HEPH*) на X-хромосоме для установления принадлежности биологических образцов к диким или домашним представителям вида *Sus scrofa* // Генетика. 2020. Т. 56. № 9. С. 1054–1064. <https://doi.org/10.31857/S0016675820080068>
7. Купень В.Н., Михалова М.Е., Снытков Е.В. и др. Биоинформатический анализ геномов коммерче-

- ских пород домашних свиней для идентификации породоспецифичных SNP // Весці Нац. акад. навук Беларусі. Серыя аграрных навук. 2021. Т. 59. № 4. С. 464–476.
<https://doi.org/10.29235/1817-7204-2021-59-4-464-476>
8. Ramos A.M. Identification of high utility SNPs for population assignment and traceability purposes in the pig using high-throughput sequencing // Anim. Genet. 2011. V. 42(6). P. 613–620.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2011.02198.x>
 9. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit // Bioinformatics. 2012. V. 28. P. 1166–1167.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
 10. Кипень В.Н., Снытков Е.В., Кривенко А.А., Патрин М.М. *In silico* анализ полиморфизма H3GA0051811 гена *HEPN* для животных вида *Sus scrofa* // VII Междунар. конф. молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов в рамках площадки открытых коммуникаций OpenBio-2020. Новосибирск: 2020. С. 469–472.
 11. Ritchie M.D., Hahn L.W., Roodi N. et al. Multifactor-dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer // Am. J. Hum. Genet. 2001. V. 69(1). P. 138–147.
<https://doi.org/10.1086/321276>

Analysis of *ADCY8* и *RYR3* Genes Polymorphism for Identification Wild and Domestic Animal of Species *Canis lupus*

V. N. Kipen^{a, *}, M. M. Patrin^b, E. V. Snytkov^{a, c}, A. N. Viarchuk^{a, d}, and A. N. Semak^e

^a*Institute of Genetics and Cytology of the National Academy
of Sciences of Belarus, Minsk, 220072 Republic of Belarus*

^b*Maxim Medical LLC, Moscow, 123423 Russia*

^c*International Sakharov Environmental Institute of Belarusian
State University, Minsk, 220070 Republic of Belarus*

^d*Scientific and Practical Center of the State Forensic Examination
Committee of the Republic of Belarus, Minsk, 220073 Republic of Belarus*

^e*WellVet LLC, Minsk, 220013 Republic of Belarus*

*e-mail: v.kipen@igc.by

As a result of the study, we confirmed the high differentiating potential of polymorphic variants g.27748425T>C (*ADCY8* gene) and g.1414373T>C (*RYR3* gene). A test model of two polymorphisms for the differentiation of a wolf and a domestic dog is proposed, which is distinguished by high values of accuracy (96.2%), specificity (96.3%) and sensitivity (98.9%). Using KASP, a quick and simple approach to differentiation based on the proposed test model has been developed, which is designed to reduce the time and cost of molecular genetic analysis, as well as reduce the risk of cross-contamination, because the process is one-stage (restriction and electrophoresis stages are excluded).

Keywords: *Canis lupus*, *Canis lupus familiaris*, SNP, differentiation, kompetitive allele-specific PCR (KASP), RFLP-PCR, high-resolution amplicon melting (HRM), *in silico* genotyping.

ПРИМЕНЕНИЕ ДНК-ШТРИХКОДИРОВАНИЯ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЗЕЛЕННЫХ ЯЩЕРИЦ (Sauria: Lacertidae: *Lacerta*)¹

© 2023 г. М. А. Доронина¹, И. В. Доронин¹ *, С. А. Луконина²,
Л. Ф. Мазанова³, К. Ю. Лотиев^{4, 5}, Н. Б. Ананьева¹

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

²Пензенский государственный университет, Пенза, 440026 Россия

³Дагестанский государственный университет, Махачкала, 367025 Россия

⁴Сочинский национальный парк, Сочи, 354002 Россия

⁵Комплексный научно-исследовательский институт
им. Х.И. Ибрагимова Российской академии наук, Грозный, 364051 Россия

*e-mail: igor.doronin@zin.ru

Поступила в редакцию 02.05.2022 г.

После доработки 28.05.2022 г.

Принята к публикации 03.06.2022 г.

ДНК-штрихкодирование остается признанным и широко используемым методом идентификации таксонов при инвентаризации и мониторинге биоразнообразия. В публикации мы приводим сведения о результатах использования этого метода при изучении зеленых ящериц рода *Lacerta*. Всего было проанализировано 67 последовательностей фрагмента гена *COI* трех видов (*L. agilis*, *L. media*, *L. strigata*). Впервые с помощью ДНК-штрихкодирования изучены все известные на Кавказе подвиды *L. agilis*, предложена филогеографическая гипотеза для *L. strigata* в кавказской части ареала. Генетическая идентификация была успешной на видовом уровне. В составе *L. agilis* в пределах Кавказа мы можем диагностировать только подвиды *L. a. boemica* и *L. a. exigua*, тогда как *L. a. brevicaudata*, *L. a. grusinica* и *L. a. mzymtensis* по выбранному маркеру неотличимы от *L. a. exigua*, а *L. a. ioriensis* от *L. a. boemica*.

Ключевые слова: *Lacerta agilis*, *Lacerta media*, *Lacerta strigata*, митохондриальная ДНК, *COI*.

DOI: 10.31857/S0016675823030037, **EDN:** INYJAE

Систематика и филогения зеленых ящериц рода *Lacerta* Linnaeus 1758, включающего по современным представлениям десять видов [1], в настоящее время претерпевает значительные изменения. Перспективным районом для исследования данных вопросов, по нашему мнению, является Кавказ [2, 3]. В пределах этого региона обитают три вида рода – прыткая, *L. agilis* Linnaeus 1758, представленная здесь шестью подвидами (*L. a. boemica* Suchow, 1929, *L. a. brevicaudata* Peters, 1958, *L. a. exigua* Eichwald, 1831, *L. a. grusinica* Peters, 1960, *L. a. ioriensis* Peters et Muskhelishvili, 1968 и *L. a. mzymtensis* Tuniyev et Tuniyev, 2008), номинативный подвид средней ящерицы – *L. m. media* Lantz et Cyrén, 1920, и монотипический вид полосатая ящерица – *L. strigata* Eichwald, 1831 ([4], www.lacerta.de). Филогенетические исследования *L. agilis* в Кавказском регионе не получили развития после рабо-

ты С.А. Калябиной-Хауф [5] и выхода ее совместной с Н.Б. Ананьевой монографии [6]. В настоящее время статус *L. a. boemica* предлагается повысить до видового (как в первоначальной публикации Г.Ф. Сухова [7]), в то время как ряд других кавказских подвидов свести в младшие синонимы *L. a. exigua* [6, 8]. Молекулярно-генетические исследования *L. a. ioriensis* и *L. a. mzymtensis* не проводились вовсе. Выходя за пределы Кавказа, отметим, что остается не решенным вопрос о таксономическом положении закарпатских популяций прыткой ящерицы [6, 9–11]. Слабо изучены филогеография и филогенетические взаимоотношения популяций *L. strigata* [12] в Кавказском регионе. Это относится и к *L. media* [13], при том что данный вид входит в надвидовой комплекс *Lacerta (trilineata)*, находящейся в фокусе исследований филогении рода *Lacerta* [1, 14].

Ранее в литературе были высказаны предположения о путях проникновения и расселения зеленых ящериц в Закавказье [15], реликтовом характере популяций полосатой ящерицы Терско-Кум-

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0016675823030037 для авторизованных пользователей.

ской низменности, Кумо-Манычской впадины [16] и Черноморского побережья Кавказа в Абхазии [17]. Одной из задач настоящего исследования являлась верификация этих предположений. Немаловажным является то обстоятельство, что ряд обозначенных таксонов зеленых ящериц включен в региональные и национальные списки охраняемых таксонов животных (Красные книги); это подчеркивает актуальность данного исследования с позиции изучения и сохранения биоразнообразия. Молекулярно-генетические данные позволяют выделить действительно уникальные популяции (за рамками принятой в настоящее время подвидовой систематики, во многом устаревшей — в случае с *L. agilis*) и обосновать необходимость их охраны. Остается актуальным и диагностика видов, поскольку во многих опубликованных работах и в базах данных по их распространению нами отмечены ошибки [18].

Сказанное выше указывает на необходимость более обстоятельного анализа филогеографии, систематики и распространения ящериц рода *Lacerta* на Кавказе и сопредельных территориях. Действенным методом в этой области продолжает оставаться ДНК-штрихкодирование (Biological identifications through DNA barcodes). В герпетологических исследованиях его эффективность показана для исследований на глобальном [19] и региональном [20–22] уровнях. Данный инструмент с успехом применяется и в исследованиях сложных в систематическом отношении групп ящериц [23].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для выделения геномной ДНК были использованы части регенерированных хвостов, фаланги пальцев передних конечностей или кожные покровы ящериц, фиксированные в 96%-ном этаноле. Ваучерные экземпляры хранятся в коллекции Зоологического института РАН (ZISP; поддержание коллекции осуществлено в рамках проекта Министерства науки и высшего образования РФ № 075-15-2021-1069) и Зоологическом музее МГУ (ZMMU). В филогенетический анализ включены 67 последовательностей фрагмента митохондриального гена первой субъединицы цитохром оксидазы (*COI*) *L. agilis*, *L. media* и *L. strigata*, собранных в 50 локалитетах (Приложение, рис. 1). Из них 62 получены в ходе проведения данного исследования, пять взяты из GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) [20–22].

В ходе изучения внешних морфометрических признаков, на которых строится систематика прыткой ящерицы [24], мы столкнулись с отсутствием надежных маркеров для диагностики ряда ее подвидов на Кавказе. По этой причине идентификация подвидов проводилась на основе сведений об их ареалах, согласно существующим на се-

годняшний день представлениям [6, 24–26]. Для сопоставления кавказских подвидов, относящихся к восточной группе [6], нами были использованы последовательности *COI* представителей западной группы подвидов — *L. agilis argus* (Laurenti, 1768) и закарпатской *L. agilis* ssp. Важно подчеркнуть, что в анализе использованы типовые экземпляры (голотип *L. a. mzymtensis* — ZISP24648) и топотипы (*L. a. boemica* — ZISP31113, *L. a. ioriensis* — ZISP29878), что делает наши выводы о систематике надежными и обоснованными.

Выделение тотальной ДНК проведено стандартным солевым методом с лизированием протеиназой K [27]. Амплификация участка гена *COI* (643 пн) осуществлялась с использованием универсальных праймеров UTF 5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT TCT CAA CCA AYC AYA ARG AYA TYG G-3' и UTR 5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACT ARA CTT CTG GRT GKC CRA ARA AYC A-3' [28] при следующих условиях: начальная денатурация 95°C — 3 мин; затем 30 циклов 95°C — 30 с, 50°C — 30 с, 72°C — 50 с; завершающий синтез 72°C — 5 мин.

Реакционная смесь для ПЦР (25 мкл) содержала 50–100 нг ДНК, 0.5 мкМ каждого праймера, 0.2 мМ dNTPs, 1.5 мМ MgCl₂, 2.5 мкл 10-кратного ПЦР-буфера (10 мМ Tris-HCl, pH 8.3, 50 мМ KCl) и 2 ед. Taq-полимеразы (Thermo Scientific). Секвенирование проводилось на генетическом анализаторе ABI PRIZM 3500xL (Applied Biosystems). Полученные последовательности были депонированы в GenBank NCBI (OM267788–OM267849).

Выравнивание последовательностей проведено в программах Geneious Prime 2021.0.1 (<https://www.geneious.com>) и AliView 1.6 [29]. Филогенетические отношения реконструированы с использованием метода Байеса (Bayesian analysis, BA) в программе Mr. Bayes 3.1.2 [30–32] и методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, ML) в программном пакете MEGA X [33]. Для BA использованы 1.5 млн генераций; статистическая надежность узлов ML-деревьев оценена путем бутстреп-анализа (2000 псевдореplik). Устойчивость узлов дендрограмм филогенетических отношений в случае BA была оценена с помощью расчета апостериорных вероятностей. Уровни поддержки узлов: 0.95 — высокий, 0.90–0.95 — средний, менее 0.90 — неподдержанный; значения бутстреп-поддержек в ML-анализе: более 75% — достоверная, 50–75% — тенденция, менее 50% — отсутствие поддержки [34]. В качестве внешней группы выбраны последовательности *Zootoca vivipara* (Lichtenstein, 1823) (MN015068) и *Timon lepidus* (Daudin, 1802) (MN015075). Кроме того, в анализе задействована *L. trilineata* Bedriaga, 1886 (MN015090).

Выбор модели эволюции для нуклеотидных последовательностей проведен в программе MrModeltest 2.4 [35] с использованием инфор-

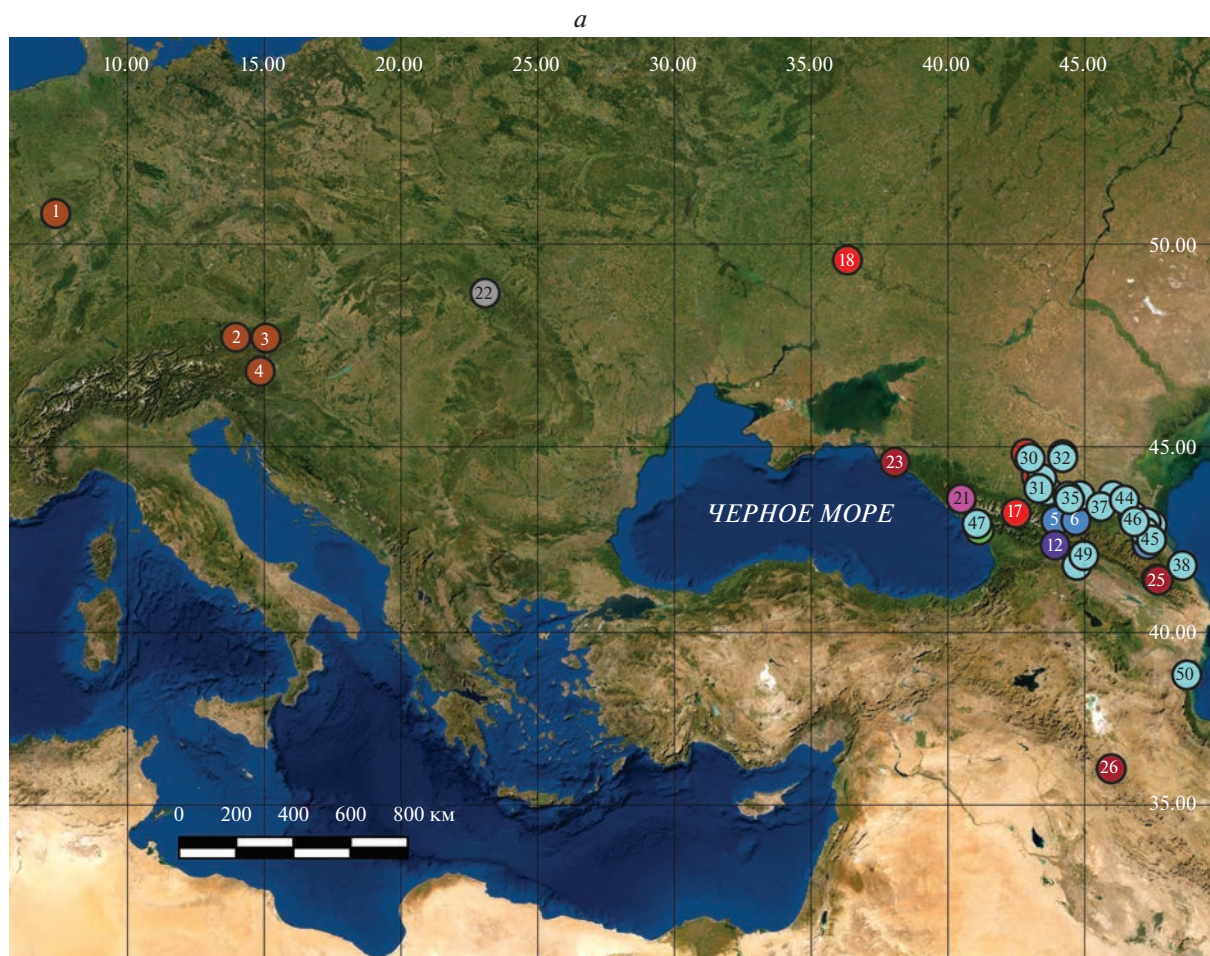


Рис. 1. Пункты сбора экземпляров *Lacerta*, использованных для молекулярно-генетического анализа: *а* — все виды, *б* — *L. agilis*, *в* — *L. media*, *г* — *L. strigata*. Нумерация соответствует таковой в приложении, цвет кружка соответствует таксону на рис. 2 и 3.

мационного критерия Акаике (AIC) — GTR (General Time Reversible) с параметрами $I = 0.3691$ и $G = 0.1844$. Графические изображения деревьев получены с помощью программы Fig-Tree 1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>). Построение сети гаплотипов осуществлялось методом TCS в программе PopART [36]. При анализе генетической изменчивости с использованием программы DnaSP v.5.10.01 [37] вычислены следующие параметры: общее количество полиморфных позиций (S), общее количество замен (η), количество гаплотипов (H), разнообразие гаплотипов (h), разнообразие нуклеотидов на сайт (π), среднее количество нуклеотидных замен (K), значение теста Таджимы (Tajima's D) и тест на нейтральность Фу (Fu's F_s). Генетические дистанции (p -дистанции) вычисляли в программе MEGA X.

Для проведения анализа таксономических границ по молекулярно-генетическим признакам использованы алгоритмы ASAP (Automated simultaneous analysis phylogenetics) [38] и ABGD (Auto-

matic barcode gap discovery) [39]. Они позволяют выявить условные молекулярные операционные таксономические единицы (Molecular phylogenetic taxonomic units, MOTU), представляющие собой монофилетические клады неопределенного ранга. Анализ проводили с использованием следующих параметров: $P_{\min}$ (минимальная априорная дистанция) = 0.01, $P_{\max}$ (максимальная априорная дистанция) = 0.1, X (относительная ширина интервала) = 0.5; была использована матрица попарных K80-дистанций.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе исследования получено 62 последовательности гена *COI* зеленых ящериц (OM267788—OM267849); ранее опубликованные пять последовательностей (KP697820, MN993135, MN993136, MN993138, MG815780) имели длину от 630 до 657 пн. 30 изученных последовательностей *L. agilis* образуют 17 гаплотипов (Нап 5—8, 10—15, 20, 22,

б

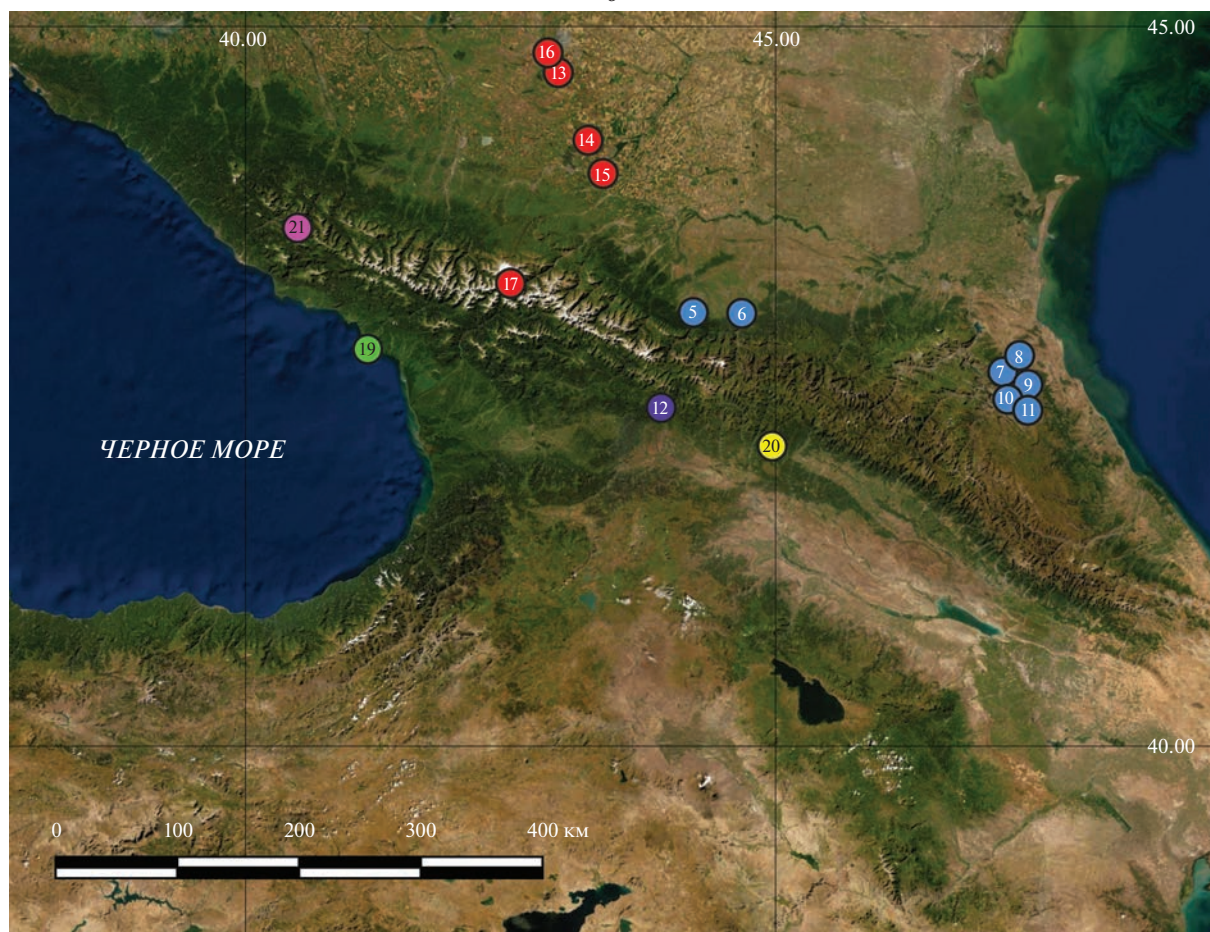


Рис. 1. Продолжение.

24–28); выявлены 54 (8.4% от общей длины фрагмента) переменные позиции, из них 43 (6.7%) парсимони информативные; соотношение транзиций к трансверсиям составило 7.6. Четыре последовательности гена *COI* *L. media* образуют три гаплотипа (Нар 16–18); выявлены 14 (2.2% от общей длины фрагмента) переменных позиций, из них — одна (0.2%) парсимони информативная; соотношение транзиций к трансверсиям составило 2.1. 33 последовательности *L. strigata* образуют семь гаплотипов (Нар 1–4, 9, 20, 22); выявлены 13 (2% от общей длины фрагмента) переменных позиций, из них — четыре (0.6%) парсимони информативные; соотношение транзиций к трансверсиям составило 7.7.

Показатели генетического разнообразия в выборке представлены в табл. 1. Относительно высокие значения гаплотипического и нуклеотидного разнообразия у прыткой ящерицы свидетельствуют о стабильной популяции с высокой численностью или о возможном вторичном контакте исторически разделенных популяций [40]. О возможном недавнем расселении полосатой ящерицы из ре-

фугиума могут говорить низкие значения показателей генетического разнообразия, а отрицательные достоверные показатели *D* — о наличии в прошлом внезапного роста популяции (экспансии) и/или положительного отбора [41].

Минимальное значение генетической дистанции (*p*-дистанции) найдено в паре видов *L. agilis*–*L. strigata* (10.1%), максимальное — *L. media*–*L. strigata* (11.8%) (табл. 2). По результатам реконструкции филогенетических взаимоотношений представителей рода *Lacerta* получены дендрограммы с идентичной топологией, на которых можно выделить пять клад с высокими бутстреп-поддержками (рис. 2). На полученной медианной сети гаплотипов (рис. 3) можно обозначить три гаплогруппы: I — *L. agilis* с тремя подгруппами (Ia — *argus*-группа, Ib — *boemica*-группа, Ic — *exigua*-группа), II — *L. media* и III — *L. strigata*. Наиболее удаленной от всех прочих является гаплогруппа III. От гаплогруппы I она отдалена на 25 нуклеотидных замен, от II — на 22. Анализ ASAP/ABGD показал наличие четкого разрыва между значениями подвидовой и видовой изменчивости (threshold distance =

6



Рис. 1. Продолжение.

= 2.9%, barcoding gap = 3.0%). Применение данных алгоритмов позволило выявить в объеме изученной выборки пять монофилетических MOTU.

ОБСУЖДЕНИЕ

Изученные виды зеленых ящериц демонстрируют высокий уровень дифференциации по гену *COI*, т.е. на нашем материале была подтверждена его видоспецифичность. На полученной дендрограмме (рис. 2) первыми обособляются *L. trilineata*

и *L. media*, традиционно включаемые в *Lacerta (trilineata)* [14]. Это не соответствует опубликованным данным, полученным с использованием фрагментов как митохондриальных (*cytb*, *12S*, *16S*), так и ядерных (*C-mos*, β -*fib*) генов [12, 14]. Так, было показано, что отделение *L. strigata* произошло на более ранних этапах радиации рода *Lacerta* [12]. Это говорит о малой эффективности ДНК-баркода для изучения филогенетических взаимоотношений видов рода *Lacerta*. Следующими на дендрограмме обособляются *L. strigata*, и, наконец, *L. agilis*.

Таблица 1. Показатели генетического разнообразия в изученных выборках зеленых ящериц рода *Lacerta*

Вид	<i>n</i>	<i>S</i> / η	<i>h</i>	π	<i>K</i>	Tajima's <i>D</i>	Fu's <i>F_s</i>
<i>L. agilis</i>	30	54/54	0.94 ± 0.02	0.029 ± 0.002	17.72	1.12 (<i>p</i> > 0.1)	0.89 (<i>p</i> > 0.1)
<i>L. media</i>	4	14/14	0.83 ± 0.02	0.011 ± 0.005	7.16	0.62 (<i>p</i> > 0.1)	2.08 (<i>p</i> > 0.1)
<i>L. strigata</i>	33	13/13	0.38 ± 0.11	0.002 ± 0.001	1.32	-1.90 (<i>p</i> < 0.05)	-1.62 (<i>p</i> < 0.05)

Примечание. *n* — объем выборки, *S* — общее количество полиморфных позиций, η — общее количество замен, *h* — разнообразие гаплотипов, π — разнообразие нуклеотидов на сайт, *K* — среднее количество нуклеотидных замен, значение Tajima's *D* — значение теста Таджимы и Fu's *F_s* — значение теста на нейтральность Фу.

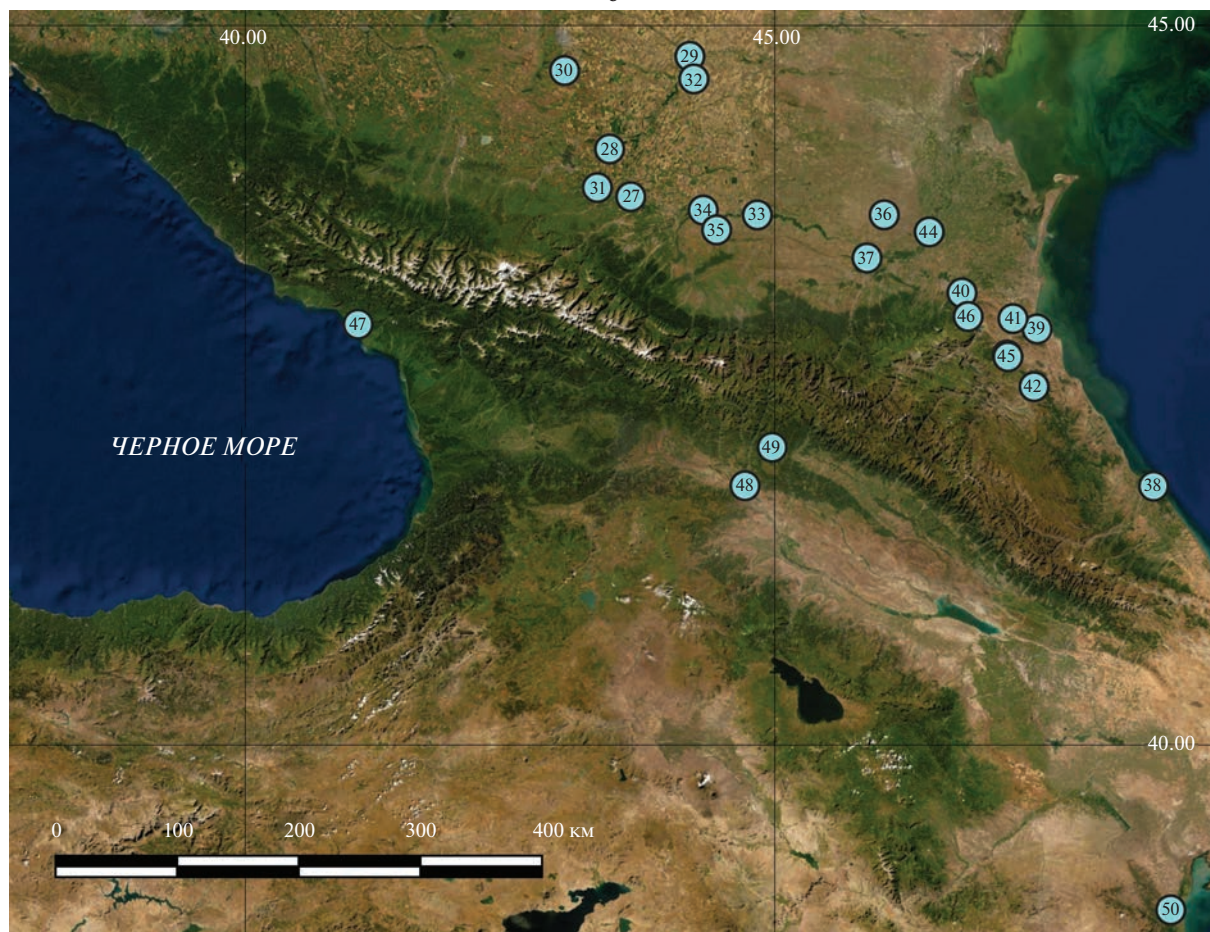


Рис. 1. Окончание.

Последовательности прыткой ящерицы, в свою очередь, сформировали три клады. Внутри *L. agilis* первой обособляется клада *L. a. boemica*, в которую вошла и *L. a. ioriensis* (p -дистанция 0.8%). Это подтверждает гипотезу о генетической близости иорской ящерицы и ящерицы Беме [15, 24, 25, 42]. Примечательно, что наиболее дистанцирована в этой выборке особь из расположенного в долине р. Терек г. Владикавказа (Нар 8). Вероятно в прошлом, в холодных перигляциальных условиях на Осетинской наклонной равнине существовали

изолированные микрорефугиумы этого таксона, приуроченные к долинам крупных рек. Косвенным подтверждением этого предположения может служить особь из близлежащего локалитета — г. Алагир в долине р. Ардон, также обладающая уникальным гаплотипом (Нар 6). Как и в предшествующих публикациях [6, 8] *L. a. boemica* продемонстрировала максимальные различия с другими подвидами *L. agilis* — 4.0–4.6% (табл. 3). В то же время отличия *L. a. boemica* от других подвидов не достигают уровня, сопоставимого с таковым между признаваемыми видами рода.

Таблица 2. Средние генетические p -дистанции (%) (под диагональю) и их стандартные отклонения (над диагональю) между видами рода *Lacerta* по данным анализа последовательностей фрагмента гена *COI* (643 пн)

Вид	<i>L. strigata</i>	<i>L. agilis</i>	<i>L. media</i>
<i>L. strigata</i>		1.1	1.3
<i>L. agilis</i>	10.1		1.2
<i>L. media</i>	11.8	11.1	

Закарпатская *L. agilis* ssp. сгруппировалась с *L. a. argus* из Австрии и Германии (p -дистанция 1.2%). Это согласуется с выводом К.Д. Мильто [43], основанном на изучении внешней морфологии. Публикации, в которых авторы отстаивают таксономическую самостоятельность закарпатских популяций на основе морфометрических признаков [9–11], не включали ее сравнение с подвидами

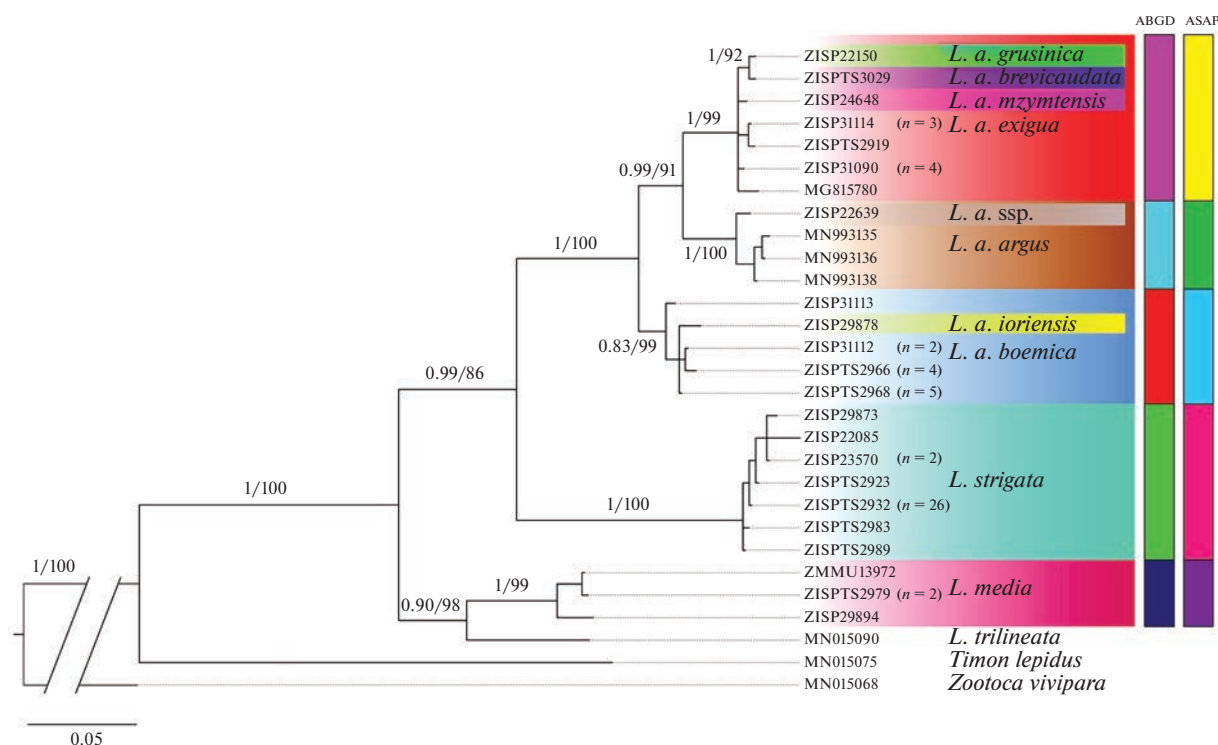


Рис. 2. Дендрограмма филогенетических отношений представителей рода *Lacerta* по результатам анализа фрагмента гена *COI* (643 пн). В узлах указаны байесовы апостериорные вероятности и бутстрэп-поддержки (BA/BS). Цветовое обозначение таксонов соответствует таковому на рис. 1. В двух столбцах разными цветами указаны выделенные молекулярные операционные таксономические единицы (MOTU).

западной группы (за исключением *L. a. chersonensis* Andrzejowski, 1832), в том числе с *L. a. argus*.

Эндемичные кавказские подвиды *L. a. brevicaudata*, *L. a. grusinica* и *L. a. mzymtensis* вошли в одну кладу с *L. a. exigua* (p -дистанция 0.3–0.8%). В ней же, по сравнению с другими кладами, наименее выражена структурированность. Ранее уже

было показано, что популяции *L. a. exigua* характеризуются настолько низкой изменчивостью митохондриального гена *cytb*, что географически удаленные популяции от Кавказа до Восточного Казахстана не имеют по этому маркеру значимых отличий [2, 6]. Это может свидетельствовать о быстром заселении прыткой ящерицей огромно-

Таблица 3. Средние генетические p -дистанции (%) (под диагональю) и их стандартные отклонения (над диагональю) между подвидами *Lacerta agilis* по данным анализа последовательностей фрагмента гена *COI* (643 пн)

Подвид	<i>L. a. argus</i>	<i>L. a. boemica</i>	<i>L. a. brevicaudata</i>	<i>L. a. exigua</i>	<i>L. a. grusinica</i>	<i>L. a. ioriensis</i>	<i>L. a. mzymtensis</i>	<i>L. a. ssp.</i>
<i>L. a. argus</i>		0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.4
<i>L. a. boemica</i>	4.6		0.8	0.8	0.8	0.3	0.8	0.8
<i>L. a. brevicaudata</i>	4.3	4.5		0.3	0.2	0.8	0.4	0.8
<i>L. a. exigua</i>	4.1	4.0	0.8		0.3	0.7	0.3	0.8
<i>L. a. grusinica</i>	4.3	4.5	0.3	0.8		0.8	0.4	0.8
<i>L. a. ioriensis</i>	4.7	0.8	4.2	3.9	4.2		0.8	0.8
<i>L. a. mzymtensis</i>	3.9	4.3	0.8	0.6	0.8	4.1		0.8
<i>L. a. ssp.</i>	1.2	4.5	4.2	3.8	4.2	4.6	3.7	

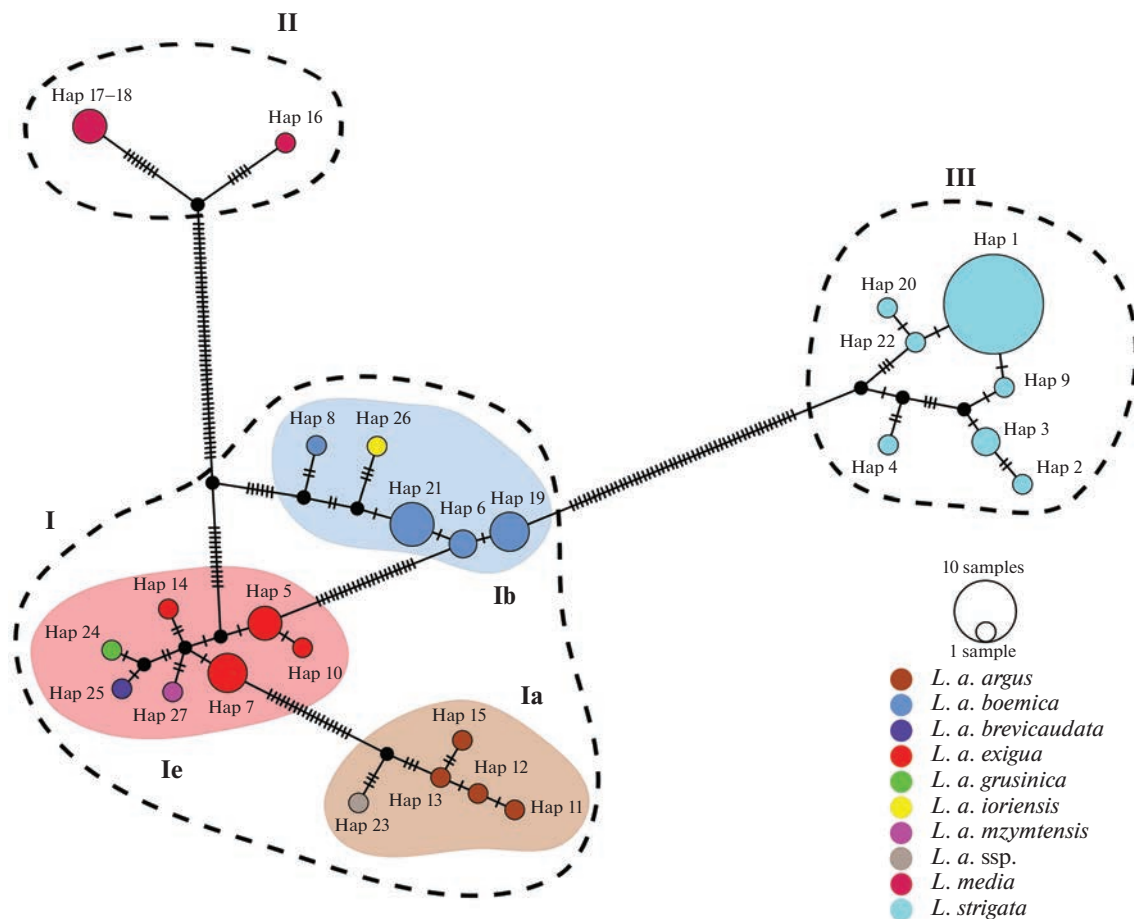


Рис. 3. Медианная сеть гаплотипов *COI* (643 пн) представителей рода *Lacerta* Кавказа и сопредельной территории. Каждый цветной кружок — уникальный гаплотип, чей размер пропорционален встречаемости в выборке; цвет кружка соответствует подвиду на рис. 1 и 2. Соединительные линии — вероятные эволюционные связи, засечки — нуклеотидные замены, черные кружки в узлах линий — предсказанные гаплотипы. Пунктирной линией ограничены группы гаплотипов (I–III), цветной заливкой обозначены подгруппы гаплотипов *L. agilis* (Ia — *argus*-группа, Ib — *boemica*-группа, Ie — *exigua*-группа).

го пространства степной и лесостепной зон Евразии в конце позднего плейстоцена — голоцене [2].

Как и в специальной работе о филогеографии *L. media* по результатам анализа гена *cytb* [13], выборки с территории Большого Кавказа и Загроса, относимые к номинативному подвиду, продемонстрировали довольно значительную генетическую дистанцию друг от друга (p -дистанция 2.1%), превышающую межпопуляционную у других изученных таксонов зеленых ящериц.

Обращает на себя внимание выраженная звездчатая структура сети гаплотипов у *L. strigata*, характеризующаяся преобладанием массового гаплотипа Нар 1, доминирующего на Северном Кавказе (Приложение). Гаплотипы с территории Северной Осетии (Нар 9) и Дагестана (Нар 20, Нар 22) незначительно отличаются от него — на одну и три нуклеотидных замены соответственно. На территории и в окрестностях с. Буглена выявлено присут-

ствие трех из них (Нар 1, 20 и 22). Последовательность особи из г. Сухуми идентична таковой из г. Мцхета (Нар 3), притом что данные локалитеты находятся на удалении более 320 км друг от друга (соответственно, в границах Колхидской низменности и на южном склоне Большого Кавказа) и характеризуются совершенно различными физико-географическими условиями. Это говорит о расселении *L. strigata* на Черноморское побережье с юго-востока, а не с севера в обход Главного Кавказского хребта. Закавказье превосходит по гаплотипическому разнообразию Северный Кавказ, который был заселен, по-видимому, лишь на поздних этапах формирования видового ареала. В целом, несмотря на наличие изолированных популяций, значительно дистанцированных гаплотипов здесь не обнаружено, что, вероятно, может рассматриваться как свидетельство молодости ареала полосатой ящерицы в регионе.

Молекулярные операционные таксономические единицы строго соответствуют признаваемым видам рода *Lacerta* и не согласуются с подвидовой структурой прыткой ящерицы. Выявленные противоречия между принятой в настоящее время внутривидовой систематикой *L. agilis* и дифференциацией подвидов по *COI*, указывают на необходимость ее пересмотра с использованием более информативных генетических маркеров. В то же время ДНК-штрихкодирование может быть использовано для видовой диагностики зеленых ящериц Кавказа и сопредельных территорий.

Авторы признательны К.Д. Мильто, В.Ф. Орловой и Б.С. Туниеву за ценные консультации и помощь в работе.

Молекулярно-генетические исследования выполнены при финансовой поддержке гранта РФФ (№ 22-24-00079).

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. Kornilios P., Thanou E., Lymberakis P. et al. A phylogenomic resolution for the taxonomy of Aegean green lizards // Zool. Scripta. 2019. V. 49. № 1. P. 14–27. <https://doi.org/10.1111/zsc.12385>
2. Кукушкин О.В., Ермаков О.А., Иванов А.Ю. и др. Филогеография прыткой ящерицы в Крыму по результатам анализа гена цитохрома *b*: древний рефугиум на полуострове, поздняя экспансия с севера и первые свидетельства гибридации подвидов *Lacerta tauridica* и *L. a. exigua* (Lacertidae: Sauria) // Тр. Зоол. ин-та РАН. 2020. Т. 324. № 1. С. 56–99. <https://doi.org/10.31610/trudyzin/2020.324.1.56>
3. Доронина М.А., Доронин И.В., Луконина С.А. и др. Филогеография и систематика ящериц рода *Lacerta* (Lacertidae: Sauria) на Кавказе и сопредельных территориях // Вопр. герпетологии: VIII съезд Герпетологического о-ва им. А.М. Никольского при РАН “Современные герпетологические исследования Евразии”. Программа и тезисы докладов. Москва: КМК, 2021. С. 147–149.
4. Uetz P., Cherikh S., Shea G. et al. A global catalog of primary reptile type specimens // Zootaxa. 2019. V. 4695. № 5. P. 438–450. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4695.5.2>
5. Калябина-Хауф С.А. Филогеография и внутривидовая структура широкоареального вида ящериц, *Lacerta agilis* L. 1758. Дисс. ... канд. биол. наук. СПб.: ЗИН РАН, 2003. 176 с.
6. Калябина-Хауф С.А., Ананьева Н.Б. Филогеография и внутривидовая структура широкоареального вида ящериц *Lacerta agilis* L., 1758 (Lacertida, Sauria, Reptilia) (опыт использования митохондриального гена цитохрома *b* // Тр. Зоол. ин-та РАН. Т. 302. СПб.: ЗИН РАН, 2004. 108 с.
7. Sookhov [Suchow] G.F. Description of a new species of lizards from the environs of Vladicaucasus (*Lacerta boemica* sp. nov.) // Zbirnyk prats' Zoolohichnogo muzeu. 1929. I. 7. P. 117–119.
8. Andres C., Franke F., Bleidorn C. et al. Phylogenetic analysis of the *Lacerta agilis* subspecies complex // Syst. and Biodiversity. 2014. V. 12. № 1. P. 43–54. <https://doi.org/10.1080/14772000.2013.878000>
9. Песков В.Н., Бровко А.Ю. Изменчивость меристических признаков фolidоза и морфологическая дифференциация *Lacerta agilis* (Lacertidae, Sauria, Reptilia) на территории Украины // Матер. Першої конференції Українського герпетологічного товариства. Київ, 2005. С. 128–134.
10. Песков В.Н., Свириденко Е.Ю., Малюк А.Ю., Котенко Т.И. Половой диморфизм и определение пола по меристическим признакам фolidоза у прыткой ящерицы, *Lacerta agilis* Linnaeus, 1758 (Reptilia, Sauria, Lacertidae) // Науковий вісник Ужгородського університету Серія Біологія. 2010. Вып. 27. С. 140–144.
11. Песков В.Н., Свириденко Е.Ю., Малюк А.Ю., Котенко Т.И. Изменчивость фolidоза и дифференциация подвидов прыткой ящерицы, *Lacerta agilis* (Reptilia, Lacertidae), на территории Украины // Вестник зоологии. 2011. Т. 45. № 6. С. 541–554.
12. Saberi-Pirooz R., Rajabi-Maham H., Ahmadzadeh F. et al. Pleistocene climate fluctuations as the major driver of genetic diversity and distribution patterns of the Caspian green lizard, *Lacerta strigata* Eichwald, 1831 // Ecol. Evol. 2021. V. 11. № 11. P. 6927–6940. <https://doi.org/10.1002/ece3.7543>
13. Доронина М.А., Доронин И.В., Луконина С.А. и др. Филогеография *Lacerta media* Lantz et Cyrén, 1920 (Lacertidae: Sauria) по результатам анализа митохондриального гена цитохрома *b* // Генетика. 2022. Т. 58. № 2. С. 177–186. <https://doi.org/10.31857/S0016675822020035>
14. Ghane-Ameleh S., Khosravi M., Saberi-Pirooz R. et al. Mid-Pleistocene transition as a trigger for diversification in the Irano-Anatolian region: Evidence revealed by phylogeography and distribution pattern of the eastern three-lined lizard // Global Ecol. and Conservation. 2021. V. 31. P. 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2021.e01839>
15. Мухелишвили Т.А. Возможные пути проникновения пресмыкающихся на территорию Грузии и некоторые характерные особенности их распространения // Сообщения Академии наук Грузинской ССР. 1970а. Т. 58. № 1. С. 209–212.
16. Тертышников М.Ф., Бадмаева В.И., Горовая В.И., Иванов В.Б. Материалы о распространении и экологии ящерицы полосатой на Северном Кавказе // Фауна и экология животных Калмыкии и сопредельных районов. Межвузовский сб. науч. трудов. Элиста: Калмыцкий гос. ун-т, 1984. С. 85–92.

17. Рудик А.М. О находке полосатой ящерицы (*Lacerta strigata* Eichwald) на Черноморском побережье Кавказа // Тр. Зоол. ин-та АН СССР. Герпетологические исследования на Кавказе. Л.: ЗИН АН СССР, 1986. С. 187–188.
18. Доронина М.А., Доронин И.В. Анализ распространения зеленых ящериц рода *Lacerta* на Кавказе и сопредельных территориях // Совр. герпетология: пробл. и пути их решения. Матер. Второй междунар. молодежной конф. герпетологов России и сопред. стран, посвященной 100-летию отделения герпетологии Зоол. ин-та РАН. СПб.: ЗИН РАН, 2019. С. 48.
19. Murphy R.W., Crawford A.J., Bauer A.M. et al. Cold Code: the global initiative to DNA barcode amphibians and nonavian reptiles // Mol. Ecol. Res. 2013. V. 13. № 2. P. 161–167.
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12050>
20. Hawlitschek O., Morinière J., Dunz A. et al. Comprehensive DNA barcoding of the herpetofauna of Germany // Mol. Ecol. Resources. 2016. V. 16. № 1. P. 242–253.
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12416>
21. Drohvalenko M., Mykhailenko A., Rekrotchuk M. et al. Application of DNA barcoding in taxonomy and phylogeny: An individual case of *COI* partial gene sequencing from seven animal species // Vestnik Zoologii. 2019. V. 53. № 5. P. 375–384.
<https://doi.org/10.2478/vzoo-2019-0034>
22. Zangl L., Daill D., Schweiger S. et al. A reference DNA barcode library for Austrian amphibians and reptiles // PLoS One. 2020. V. 15. № 3. P. e0229353.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229353>
23. Дунаев Е.А., Соловьева Е.Н., Поярков Н.А. Таксономия, филогения и распространение *Phrynocephalus* (superspecies *guttatus*) (Reptilia: Agamidae) // Совр. герпетология. 2020. Т. 20. Вып. 1/2. С. 16–34.
<https://doi.org/10.18500/1814-6090-2020-20-1-2-16-34>
24. Даревский И.С., Щербак Н.Н., Петерс Г. и др. Систематика и внутривидовая структура // Прыткая ящерица. Монографическое описание вида / Отв. ред.: Яблоков А.В. М.: Наука, 1976. С. 53–95.
25. Мухелишвили Т.А. Пресмыкающиеся Восточной Грузии. Тбилиси: Мецниереба, 1970. 235 с.
26. Tuniyev S.B., Tuniyev B.S. Intraspecific variation of the Sand lizard (*Lacerta agilis*) from the Western Caucasus and description of a new subspecies *Lacerta agilis mzymtensis* ssp. nov. (Reptilia: Sauria) // Russ. J. Herpetology. 2008. V. 15. № 1. P. 55–66.
<https://doi.org/10.30906/1026-2296-2008-15-1-55-66>
27. Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high genomic DNA for PCR-based techniques // Nucl. Ac. Res. 1997. V. 25. № 22. P. 4692–4693.
<https://doi.org/10.1093/nar/25.22.4692>
28. Lisovsky A.A., Obolenskaya E.V., Abramson N.I. et al. Geographic variation of *Microtus middendorffii* (Cricetidae, Arvicolinae, Rodentia) sensu lato studied by craniometrical and mitochondrial features // Russ. J. Theriol. 2010. V. 9. № 2. P. 71–81.
<https://doi.org/10.15298/rusjtheriol.09.2.03>
29. Larsson A. AliView: A fast and lightweight alignment viewer and editor for large data sets // Bioinformatics. 2014. V. 30. I. 22. P. 3276–3278.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531>
30. Huelsenbeck J., Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees // Bioinformatics. 2001. V. 17. № 8. P. 754–755.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>
31. Ronquist F., Huelsenbeck J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // Bioinformatics. 2003. V. 19. № 12. P. 1572–1574.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>
32. Altekar G., Dwarkadas S., Huelsenbeck J.P., Ronquist F. Parallel metropolis coupled Markov chain Monte Carlo for Bayesian phylogenetic inference // Bioinformatics. 2004. V. 20. № 3. P. 407–415.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg427>
33. Kumar S., Stecher G., Li M. et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // Mol. Biol. and Evol. 2018. V. 35. № 6. P. 1547–1549.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
34. Felsenstein J. Inferring Phylogenies. Sunderland: Sinauer Associates, 2004. 664 p.
35. Nylander J.A.A. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University. 2004. <https://github.com/nylander/Mr-Modeltest2>
36. Leigh J.W., Bryant D. PopART: Full-feature software for haplotype network construction // Meth. in Ecol. and Evol. 2015. V. 6. № 9. P. 1110–1116.
<https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>
37. Librado P., Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // Bioinformatics. 2009. V. 25. № 11. P. 1451–1452.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
38. Sarkar I.N., Egan M.G., Coruzzi G. et al. Automated simultaneous analysis phylogenetics (ASAP): An enabling tool for phylogenomics // BMC Bioinformatics. 2008. V. 9. № 103. P. 1–5.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-103>
39. Puillandre N., Lambert A., Brouillet S., Achaz G. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation // Mol. Ecol. 2012. V. 21. № 8. P. 1864–1877.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x>
40. Абрамсон Н.И. Филогеография: итоги, проблемы, перспективы // Вестник ВОГиС. 2007. Т. 11. № 2. С. 307–331.
41. Fu Y.-X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection // Genetics. 1997. V. 147. P. 915–925.
<https://doi.org/10.1093/genetics/147.2.915>
42. Peters G., Muxheliswili T.A. *Lacerta agilis ioriensis* — eine neue Subspecies der kaukasischen Zauneidechsen // Zool. Jb. Syst. 1968. V. 95. P. 213–228.
43. Milto K.D. On the Systematic Position of the Sand Lizard (*Lacerta agilis* Linnaeus, 1758) in the Western Ukraine // Russ. J. Herpetology. 1996. V. 3. № 2. P. 199–200.

Application of DNA Barcoding to the Study of Green Lizards (Sauria: Lacertidae: *Lacerta*)

M. A. Doronina^a, I. V. Doronin^{a, *}, S. A. Lukonina^b,
L. F. Mazanaeva^c, K. Yu. Lotiev^{d, e}, and N. B. Ananjeva^a

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

^bPenza State University, Penza, 440026 Russia

^cDagestan State University, Makhachkala, Dagestan, 367025 Russia

^dSochi National Park, Sochi, 354002 Russia

^eIbragimov Complex Institute of the Russian Academy of Sciences, Grozny, 364051 Russia

*e-mail: igor.doronin@zin.ru

DNA barcoding remains a recognized and widely used method for taxon identification in biodiversity inventory and monitoring. In this publication, we present information about the results of using this method in the study of green lizards of the genus *Lacerta*. A total of 67 sequences of the *COI* gene fragment of three species (*L. agilis*, *L. media*, *L. strigata*) were analyzed. For the first time, all subspecies of *L. agilis* known in the Caucasus were studied using DNA barcoding, and a phylogeographic hypothesis for *L. strigata* in the Caucasian part of the range was proposed. Genetic identification has been successful at the species level. In the composition of *L. agilis* within the Caucasus, we can diagnose only the subspecies *L. a. boemica* and *L. a. exigua*, while *L. a. brevicaudata*, *L. a. grusinica* and *L. a. mzymtensis* are identical from *L. a. exigua*, while *L. a. ioriensis* from *L. a. boemica*.

Keywords: *Lacerta agilis*, *Lacerta media*, *Lacerta strigata*, mitochondrial DNA, *COI*.

ПОЛИМОРФИЗМ 27 АУТОСОМНЫХ STR-ЛОКУСОВ У НАСЕЛЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ ПО ДАННЫМ МАССОВОГО ПАРАЛЛЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ¹

© 2023 г. С. А. Котова^{1, *}, А. С. Парфёнова¹, Т. В. Забавская¹,
В. И. Рыбакова¹, Е. А. Спивак¹, С. А. Полевой², А. В. Луговнёв³

¹Научно-практический центр государственного комитета судебных экспертиз
Республики Беларусь, Минск, 220114 Республика Беларусь

²Масариков университет, Брно, 60177 Чехия

³Государственный комитет судебных экспертиз
Республики Беларусь, Минск, 220073 Республика Беларусь

*e-mail: svetlkotova@mail.ru

Поступила в редакцию 27.04.2022 г.

После доработки 26.05.2022 г.

Принята к публикации 23.06.2022 г.

С использованием технологии массового параллельного секвенирования (МПС) проведено исследование полиморфизма 27 аутосомных STR-локусов коммерческой панели ForenSeq DNA Signature Prep Kit у 733 неродственных индивидов, представляющих население Республики Беларусь, и сформирована популяционная база частот МПС-аллелей для вероятностных расчетов при судебно-экспертной идентификации личности и установлении биологического родства. Соответствие между генотипами, полученными МПС и капиллярным электрофорезом (КЭ), составило 99.96%. Для восьми локусов (*D12S391*, *D21S11*, *D2S1338*, *vWA*, *D3S1358*, *D8S1179*, *D13S317*, *D9S1122*) количество МПС-аллелей увеличилось более чем в 2 раза. В исследованной выборке идентифицировано 13 новых аллелей, отсутствующих в каталоге STRSeq BioProject международной онлайн-базы данных STRbase 2.0. Средняя вероятность случайного совпадения 27-локусных МПС-профилей уменьшилась с 1.43×10^{-31} до 2.89×10^{-35} , а комбинированный индекс родства возрос с 2.08×10^{10} до 3.25×10^{12} по сравнению с данными КЭ.

Ключевые слова: аутосомный STR-локус, полиморфизм, изометрические аллели, массовое параллельное секвенирование.

DOI: 10.31857/S0016675823030074, **EDN:** IONQNZ

Микросателлитные (short tandem repeat, STR) локусы аутосом являются одними из наиболее широко применяемых маркеров в экспертном ДНК-анализе. Благодаря большому числу аллелей на локус и кодоминантному наследованию они позволяют с высокой вероятностью идентифицировать личность, а также устанавливать биологическое родство [1]. Уже более чем два десятилетия стандартной технологией получения STR-профиля ДНК является капиллярный электрофорез (КЭ), позволяющий выявлять полиморфизм микросателлитных локусов, обеспечивающийся вариативностью числа tandemных повторов. Благодаря стремительному развитию и внедрению в практику методов массового параллельного секвенирования (МПС) стало возможно получать детальную ин-

формацию о нуклеотидной последовательности традиционных криминалистических STR-маркеров [2]. К основным преимуществам технологии МПС судебные генетики также относят возможность одновременного анализа большого количества микросателлитов с длинами аллелей до 400 пн, что в сочетании с высокой чувствительностью метода значительно повышает эффективность анализа деградированной ДНК, а выявление значительного количества изоаллелей, обусловленных различиями в области как tandemного повтора, так и фланкирующих регионов, способствует лучшему разделению смесей в случае маскировки аллелей при использовании капиллярного электрофореза. Это привело к возникновению различных МПС-платформ, использующих маркеры, подходящие для криминалистических целей. Примером двух таких платформ являются MiSeq FGx Forensic Genomics System (Illumina, США) и Ion GeneStu-

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0016675823030074 для авторизованных пользователей.

dio S5 System (Thermo Fisher Scientific, США), которые предлагают криминалистам наборы ForenSeq DNA Signature Prep kit (Verogen, США) и Precision ID GlobalFiler™ NGS STR Panel v2 (Thermo Fisher Scientific) [3, 4]. Вышеуказанные компании сотрудничают с научным консорциумом для совершенствования своих продуктов и включают в наборы маркеры, наиболее релевантные по литературным данным. Благодаря этому для ForenSeq DNA Signature Prep Kit и Precision ID GlobalFiler™ NGS STR Panel v2 общими являются 22 аутосомных STR-маркера.

С 2018 г. методы МПС начали активно внедряться в экспертную практику в Республике Беларусь. Для того чтобы в полной мере использовать более высокий дискриминирующий потенциал, предоставляемый полученными с использованием МПС-технологий результатами исследования STR-локусов, необходимо обновление данных частот встречаемости, которые бы содержали сведения о секвенированных аллелях. Все ранее проведенные в Республике Беларусь популяционные исследования базировались на классических технологиях, которые таких сведений не содержат и таким образом не могут обеспечить необходимый уровень информативности [5, 6].

В настоящем исследовании представлены результаты массового параллельного секвенирования 27 аутосомных STR-локусов панели ForenSeq DNA Signature Prep Kit (Illumina) у 733 индивидов, проживающих в Республике Беларусь. Для верификации результатов секвенирования и обеспечения их совместимости с ранее разработанной базой данных [5, 6] генотипы 165 образцов были проверены на конкордантность путем генотипирования 22 перекрывающихся аутосомных локусов с использованием набора для капиллярного электрофореза PowerPlex Fusion 6C System (Promega Corporation, США). Все МПС-аллели, выявленные в белорусской популяции, сравнивали с опубликованными и включенными в международные онлайн-базы данными [7] с целью обнаружения не описанных ранее вариантов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы биологического материала и выделение ДНК

Образцы венозной крови отбирали у анонимных доноров после получения письменного информированного согласия на проведение исследования и опубликование его результатов в открытой печати с соблюдением полной конфиденциальности полученной от участников информации. Всего исследовано 733 неродственных индивида мужского пола, проживающих в шести регионах страны: юго-запад (Брестская область) — 137; юго-восток (Гомельская область) — 111; запад (Грод-

ненская область) — 122; восток (Могилевская область) — 118; север (Витебская область) — 100 и центральный регион (Минская область) — 145.

Забор венозной крови осуществлялся с помощью систем типа Vacutainer (Becton Dickinson International, США) при участии специалистов Республиканского научно-практического центра трансфузиологии и медицинских биотехнологий. До выделения ДНК все образцы крови хранили при температуре -20°C .

ДНК выделяли из лейкоцитарной фракции венозной крови по методу, описанному в [8], после предварительного этапа гемолиза эритроцитов. Очистку ДНК проводили с помощью органических растворителей [9]. Концентрацию ДНК измеряли на капельном спектрофотометре DeNovix (DeNovix, США) в соответствии с протоколом производителя.

Подготовка геномных библиотек

Подготовку библиотек для секвенирования аутосомных STR-маркеров осуществляли с использованием набора ForenSeq™ DNA Signature Prep Kit (Verogen, США) согласно инструкции производителя [10]. Предварительно измеряли концентрацию образцов ДНК на приборе Quantus™ Fluorometer (Promega, США). Образцы ДНК нормализовали до конечной концентрации 0.2 нг/мкл. Для первой ПЦР использовали пул праймеров *B*, предназначенный для совместной амплификации 231 маркера ядерной ДНК, включая 27 аутосомных STR, 24 Y-STR, 7 X-хромосомных STR, 94 идентифицирующих SNP, 56 геногеографических SNP, 22 фенотипических SNP и амелогенин. В качестве положительного контроля реакции амплификации использовали 1 нг контрольной ДНК 2800M (Promega Corporation, США), в качестве отрицательного — деионизированную воду. Амплификацию проводили на термочиклере C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad, США) согласно инструкции производителя [10]. Целевое обогащение, индексирование, очистку и нормализацию геномных библиотек выполняли следуя протоколу производителя. Готовые нормализованные библиотеки смешивали в одной пробирке, проводили денатурацию и загружали на проточную ячейку MiSeq FGx® Reagents Kit (Verogen). Для всех пулов число библиотек соответствовало рекомендованному производителем числу в 32 библиотеки. Секвенирование проводили в режиме экспертного геномного ДНК-анализа.

Секвенирование и анализ результатов

Секвенирование библиотек проводили на платформе MiSeq FGx™ (Illumina Inc., США), обработку результатов выполняли с помощью интегрированного в систему программного обеспече-

ния ForenSeq Universal Analysis Software (ForenSeq UAS) (Illumina Inc.). Генотипы образцов по ауто-сомным STR-маркерам *D3S1358*, *vWA*, *D16S539*, *CSF1PO*, *TPOX*, *D8S1179*, *D21S11*, *D18S51*, *D2S441*, *D19S433*, *TH01*, *FGA*, *D22S1045*, *D5S818*, *D13S317*, *D7S820*, *D10S1248*, *D1S1656*, *D12S391*, *D2S1338*, *D6S1043*, *PentaD*, *PentaE*, *D4S2408*, *D9S1122*, *D17S1301*, *D20S482* анализировали на основе стандартных выходных данных, включавших отчет о генотипе на уровне проекта и отчет о деталях образца на уровне генотипа, сгенерированных ForenSeq UAS на листах Microsoft Excel. По умолчанию минимальные пороговые значения для анализа (АП) и интерпретации данных (ИП) принимали 10 и 30 прочтений соответственно для всех аутосомных STR-локусов.

Генотипы регистрировали как число tandem-ных повторов в вариабельной области микросателлита, автоматически зарегистрированное ForenSeq UAS; также анализировали первичную последовательность вариабельной области STR-маркера. Для локусов *D12S317*, *D18S51*, *D19S433*, *D5S818*, *D7S820* и *vWA* дополнительно изучали нуклеотидную последовательность доступного для анализа небольшого фланкирующего участка, непосредственно прилегающего к tandemной области. Однонуклеотидные варианты полиморфизма, обнаруженные в области tandemного повтора и на доступных для анализа фланкирующих участках микросателлитов, регистрировали как вариант замены по отношению к референсному геному GRCh37.p13 [11]. Последовательности аллельных вариантов описывали согласно требованиям Международного общества по судебной генетике [12]; аллелям присваивали численно-буквенные названия.

Верификация с данными капиллярного электрофореза

Для верификации полученных МПС-генотипов контрольную ДНК 2800M и 165 образцов ДНК популяционной выборки, отобранных случайным образом, генотипировали с использованием набора PowerPlex® Fusion 6C System (Promega Corporation), который включает 22 общих с ForenSeq™ DNA Signature Prep Kit аутосомных локусов: *D3S1358*, *vWA*, *D16S539*, *CSF1PO*, *TPOX*, *D8S1179*, *D21S11*, *D18S51*, *D2S441*, *D19S433*, *TH01*, *FGA*, *D22S1045*, *D5S818*, *D13S317*, *D7S820*, *D10S1248*, *D1S1656*, *D12S391*, *D2S1338*, *PentaD*, *PentaE*. Все эксперименты проводили в соответствии с протоколами производителя реагентов. Продукты ПЦР разделяли методом КЭ на генетическом анализаторе AB3500 (Thermo Fischer Scientific). Генотипы образцов определяли с использованием программного обеспечения GeneMapper ID-X 1.4 (Thermo Fisher Scientific). Результаты генотипирования, полученные методами МПС и КЭ, сравнивали,

дискордантность определяли как любой случай, когда аллель, обнаруженный с помощью одного метода, не обнаруживался с помощью другого. В случаях, когда глубина прочтения для одного из аллелей профиля была ниже ИП и аллель не регистрировался программным обеспечением, несоответствие считали обусловленным “выпадением” аллеля (*allele drop-out*) [13].

Популяционные данные и криминалистические параметры информативности

Изменение уровня генетического разнообразия и криминалистических параметров оценивали сравнивая значения наблюдаемой гетерозиготности (H_O) и вероятности случайного совпадения (MP), рассчитанные для двух массивов МПС-генотипов, включающих: 1) аллели, определенные по числу tandemных повторов (КЭ-аллели) и 2) аллели, определенные по нуклеотидной последовательности (МПС-аллели).

Частоты аллелей для 27 аутосомных STR-локусов и наблюдаемую гетерозиготность (H_O) рассчитывали на основе результатов МПС-генотипирования 733 популяционных образцов средстами программного пакета GenAlEx 6.5 [14].

Криминалистические параметры информационной значимости: силу различения двух генотипов (PD), силу исключения (PE), типичный индекс отцовства (TPI) и их комбинированные значения рассчитывали с использованием алгоритмов FORSTAT v1.0 [15].

Оценку уровня генетической подразделенности популяции (F_{ST}) проводили методом анализа молекулярной дисперсии (Analysis of Molecular Variance, AMOVA) в программном пакете Arlequin 3.5 [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью формирования базы данных частот МПС-аллелей 27 криминалистических STR-локусов для резидентного населения Республики Беларусь в ходе настоящего исследования секвенировано 39 582 фрагмента ДНК для 733 индивидов и получены данные о 19 767 генотипах (99.87% всех возможных STR-генотипов), а также изучена внутренняя структура области tandemного повтора аллельных вариантов микросателлитов. Для 24 образцов данные о генотипах отсутствовали в локусах *D1S1656* (12 образцов), *PentaE* (7 образцов), *PentaD* (4 образца) и *D21S11* (1 образец). При анализе файлов отчетов, сгенерированных ForenSeq UAS, во всех случаях последовательности аллелей для этих образцов были обнаружены, однако поскольку уровень прочтений для них был ниже установленного ИП (30 ридов) программным обеспечением они не регистрировались. Такие образцы из дальнейшего анализа исключали.

Таблица 1. Результаты соответствия МПС-аллелей 22 аутосомных STR-локусов, перекрывающихся с PowerPlex® Fusion 6C System

Локус	Количество секвенированных (МПС) аллелей	Количество конкордантных аллелей	Конкордантность, %
<i>Amelogenin</i>	324	324	100
<i>D3S1358</i>	324	324	100
<i>vWA</i>	324	324	100
<i>D16S539</i>	324	324	100
<i>CSF1PO</i>	324	324	100
<i>TPOX</i>	324	324	100
<i>D8S1179</i>	324	324	100
<i>D21S11</i>	324	324	100
<i>D18S51</i>	324	324	100
<i>D2S441</i>	324	324	100
<i>D19S433</i>	324	324	100
<i>TH01</i>	324	324	100
<i>FGA</i>	324	324	100
<i>D22S1045</i>	320	320	100
<i>D5S818</i>	324	322	99.38
<i>D13S317</i>	324	324	100
<i>D7S820</i>	324	323	99.69
<i>D10S1248</i>	324	324	100
<i>DIS1656</i>	317	317	100
<i>D12S391</i>	324	324	100
<i>D2S1338</i>	324	324	100
<i>PentaD</i>	324	324	100
<i>PentaE</i>	322	322	100

Исследование на конкордантность генотипирования

Соответствие между генотипами, установленными капиллярным электрофорезом (КЭ-генотипами) и генотипами, полученными методом МПС (МПС-генотипами), было исследовано для 165 образцов популяционной выборки. Для трех образцов ДНК МПС-генотипы в локусах *DIS1656*, *PentaE* и *PentaD* не регистрировались, эти образцы были исключены из сравнительного анализа. Результаты исследования конкордантности МПС- и КЭ-генотипирования для 162 образцов ДНК представлены в табл. 1.

Дискордантность результатов генотипирования наблюдали в 16 из 3564 сравнений (0.45%), при этом все случаи несоответствия были установлены для пяти локусов: *DIS1656*, *D22S1045*, *D5S818*, *D7S820*, *PentaE*. Для локусов *DIS1656*, *D22S1045*, *PentaE* все случаи несовпадения генотипов были связаны с “выпадением” более длинного аллеля гетерозиготного МПС-профиля, в локусе *D5S818* во всех случаях выпадал более короткий аллель. При анализе файлов отчетов ForenSeq

UAS “выпадающие” аллели обнаруживали, однако уровень прочтений для них был ниже установленного ИП (<30 ридов) (рис. 1,а). Больше всего случаев “выпадения” аллелей зарегистрировано для локуса *DIS1656* (7 образцов), при этом в пяти из семи случаев это были аллели вида X.3, включающие тринуклеотид [TCA]. Согласно [17] аллели X.3 в локусе *DIS1656* значительно хуже секвенируются по сравнению с аллелями без тринуклеотида, что приводит к высокой несбалансированности гетерозигот вида X/X.3.

В локусе *D22S1045* наблюдали дискордантность КЭ- и МПС-генотипов для четырех образцов: три образца имели гомозиготные МПС-генотипы “15/15” и один – “11/11”, тогда как по данным генотипирования тест-системой PowerPlex® Fusion 6C для этих образцов были установлены гетерозиготные профили “15/19” и “11/15” соответственно (рис. 1,б). Несбалансированная амплификация локуса *D22S1045* является известной особенностью тест-системы ForenSeq™, и производитель прямо указывает на необходи-

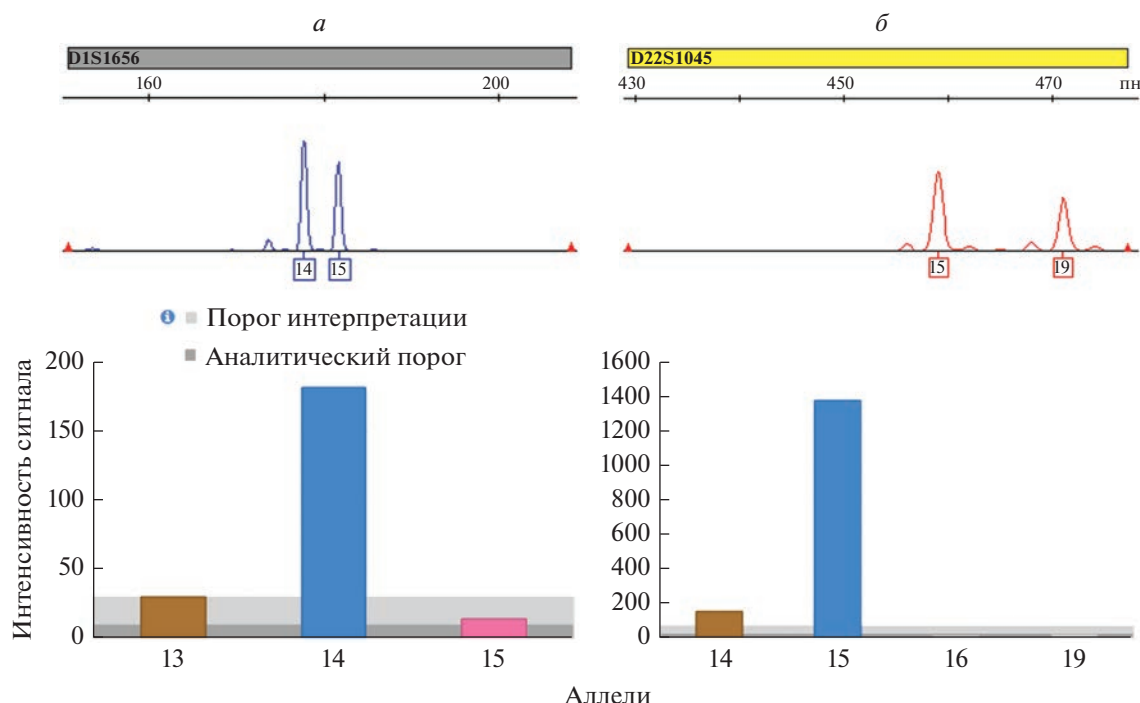


Рис. 1. Результаты генотипирования локусов *DIS1656* и *D22S1045* методами КЭ (вверху) и МПС (внизу) при исследовании конкордантности. *a* – локус *DIS1656*, КЭ-генотип “14/15”, МПС-генотип “14/14”; *б* – локус *D22S1045*, КЭ-генотип “14/19”, МПС-генотип “15/15”.

мость с осторожностью интерпретировать гомозиготные профили по этому маркеру [10].

В локусе *D7S820* для одного из образцов был зарегистрирован КЭ-генотип “10/10.3” и МПС-генотип “10/11”. В локусе *D5S818* несоответствие генотипов обнаружено в двух образцах (КЭ-аллели: “9/11”, МПС: “11” и КЭ: “12/13”, МПС: “13”) и в обоих случаях для незарегистрированных программным обеспечением аллелей (9 и 12) обнаруживались прочтения ниже ИП (<30 ридов).

Наблюдаемые случаи несовпадения генотипов для локусов *D5S818* и *D7S820* были аналогичны описанным ранее наблюдениям [13, 18, 19]. Например, L. Devesse et al. [13] для локуса *D7S820* наблюдали КЭ-аллель 9.2, состоящий из 10 тетра-нуклеотидных повторов, и аллель 7, который был генотипирован как 6.3 на основе методов КЭ. Авторами установлено, что в обоих случаях расхождения связаны с делециями во фланкирующей области – двух оснований на фланке аллеля 10 и одного основания на фланке аллеля 7 (редкая делеция rs540346880, [T/–], обнаруженная в европеоидной популяции с частотой менее 0.01%) (рис. 2, *a*). В этом же исследовании описан случай “выпадения” короткого аллеля в локусе *D5S818* (по данным КЭ: “9/11”; по данным МПС: “11”). Путем секвенирования более длинного ампликона L. Devesse et al. [13] удалось обнаружить редкую, не описанную ранее однонуклеотидную за-

мену G>C, расположенную в сайте связывания обратного праймера, которая снижала успешность амплификации короткого аллеля 9 (рис. 2, *б*).

Таким образом, нами показано, что между генетическими профилями 162 образцов, установленными параллельно двумя методами, отсутствуют серьезные несоответствия – конкордантность данных составляет 99.96% (табл. 1). Во всех случаях для незарегистрированных аллелей МПС-профилей имелись прочтанные последовательности, размер которых соответствовал данным КЭ-генотипирования, за исключением одного описанного выше случая для локуса *D7S820*. Вместе с тем результаты исследования позволяют акцентировать внимание на особенностях интерпретации данных, получаемых методом МПС с использованием коммерческого набора ForenSeq DNA Signature Prep Kit [10]. В частности, исследователи должны с особой осторожностью интерпретировать результаты секвенирования не только для локуса *D22S1045*, на что указывает производитель набора, но и для локусов *D5S818*, *DIS1656* и *D7S820*. В соответствии с рекомендациями Национального исследовательского совета США (NRC II Recommendations for Estimating Random-Match Probabilities) [20] чтобы компенсировать эффекты возможных нулевых аллелей в локусах *D5S818*, *DIS1656*, *D22S1045* при оценке вероятности случайного совпадения генотипов



Рис. 2. Мутации фланкирующих последовательностей, приводящие к возникновению “нулевых аллелей” при МПС-генотипировании локусов *D7S820* и *D5D818*. Адаптировано из [13]. *a* — локус *D7S820* (rs540346880); *б* — локус *D5S818*.

может применяться высококонсервативный подход, при котором частоту (f) для гетерозигот рассчитывают как $f = 2pq$, а для гомозигот — как $f = p$ вместо $f = p^2$. Более точная, но также консервативная процедура расчета заключается в использовании уравнения $f = p^2 + p(1 - p) \times \theta$ со значением $\theta = 0.003$ [20].

Генетическое разнообразие и криминалистическая информативность секвенированных аутосомных STR-локусов

Из 39534 аллелей, секвенированных у 733 индивидов в 27 локусах, был идентифицирован 301 вариант различной длины и 517 изометрических вариантов (аллелей одинаковой длины, но разной последовательности).

Число аллелей увеличилось более чем в 2 раза ($\times 2$) у восьми локусов: *D12S391* ($\times 4.24$), *D21S11* ($\times 3.43$), *D2S1338* ($\times 3.07$), *vWA* ($\times 2.63$), *D3S1358* ($\times 2.44$), *D8S1179* ($\times 2.0$), *D13S317* ($\times 2.11$), *D9S1122* ($\times 2.0$). Всего из 27 аутосомных STR-локусов изоаллели наблюдались в 19 (70.37%). Для восьми локусов не зафиксировано дополнительных МПС-аллелей (*PentaE*, *PentaD*, *D20S482*, *CSF1PO*, *TPOX*, *D10S1248*, *TH01*, *D16S539*) (табл. 2). Полученные в нашем исследовании результаты хорошо согласуются с данными других авторов, полученными при исследовании европейских и азиатских популяций [13, 17–19, 21–24].

Для шести локусов (*D19S433*, *D7S820*, *D18S51*, *D5S820*, *D13S317* и *vWA*) дополнительно были проанализированы предоставляемые ForenSeq UAS данные о последовательности небольших фланкирующих участков, непосредственно прилегающих к тандемной области. Для двух локусов *D7S820* и *D18S51* не показано увеличения количества аллелей за счет фланков — варибельность отмечалась исключительно в области повтора. С учетом информации о фланкирующих последовательностях в локусе *D19S433* был идентифицирован редкий изоаллель 13.2 — *D19S433[CE13.2]-Chr19 GRCh37p.13 30417142-30417205 [CCTT]12 ccta CCTT cttt CCTT rs745607776-del*; в локусе *D13S317* — во-

семь изоаллелей с описанными частыми мутациями А>Т в первой и пятой позициях на 3'-фланкирующей области повтора (rs9546005, rs202043589); в локусе *vWA* — четыре изоаллеля: 14 и 15 (rs75219269 А>G), 16, 17 (rs199970098 G>A) с полиморфизмом во фланкирующей области. Тогда как для локуса *D5S818* вся варибельность обеспечивалась известной мутацией во фланкирующем участке (rs73801920 С>А) [24] и только в одном случае был обнаружен описанный ранее вариант аллеля 12, несущий мутацию (rs1171357623, Т>G) в четвертом тандеме [24] (табл. 3).

Из 517 различных аллелей, идентифицированных в белорусской популяции, 13 ранее не были описаны (табл. 4). Среди впервые обнаруженных аллелей семь были обусловлены новой комбинацией повторяющихся блоков в тандемной области, пять имели однонуклеотидные замены внутри тандемного повтора и один аллель — 15 в локусе *D5S818* имел на фланке мутацию rs73801920, описанную ранее, но в комбинации с этим вариантом аллеля не встречавшуюся в других исследованных популяциях, согласно сведениям STRBase 2.0 [7]. Все ранее не описанные аллели зарегистрированы в базе данных Nucleotide NCBI под номерами ON248964, ON359896—ON359907.

При оценке уровня генетического разнообразия белорусской популяции с учетом данных МПС-генотипирования показано увеличение значений наблюдаемой гетерозиготности (H_o) для всех локусов с выявленными изоаллельными вариантами, кроме локусов *FGA*, *D17S1301*, *D18S51*, *D22S1045*. В наибольшей степени H_o увеличивалась для локуса *D4S2408* — в 1.32 раза. Для этого локуса выявлен полиморфизм нуклеотидной последовательности области тандемного повтора только для аллеля 9, имеющего максимальную частоту встречаемости в популяции (59.5%), при этом частота встречаемости двух выявленных изоморфных вариантов оказалась практически одинаковой — 0.2196 и 0.1869. Таким образом, из 261 образца, имевшего по данным КЭ-анализа гомозиготный генотип “9/9”, 137 образцов, т.е. более

Таблица 2. Число STR-аллелей, идентифицированных методом капиллярного электрофора (КЭ-аллели) и массовым параллельным секвенированием (МПС-аллели)

Локус	КЭ-аллели	МПС-аллели	Прирост, <i>n</i> (%)
<i>D12S391</i>	17	72	+ 55 (324)
<i>D21S11</i>	15	48	+ 33 (220)
<i>D2S1338</i>	14	43	+ 29 (207)
<i>vWA</i>	8	21	+ 13 (163)
<i>D3S1358*</i>	9	22	+ 13 (144)
<i>D13S317</i>	9	19	+ 10 (111)
<i>D8S1179</i>	11	22	+ 11 (100)
<i>D9S1122</i>	6	12	+ 6 (100)
<i>D5S818*</i>	9	17	+ 8 (89)
<i>D2S441</i>	9	13	+ 4 (44)
<i>D1S1656</i>	19	28	+ 9 (47)
<i>D6S1043</i>	16	23	+ 7 (44)
<i>D19S433</i>	16	22	+ 6 (38)
<i>D7S820</i>	8	10	+ 2 (25)
<i>FGA</i>	19	23	+ 4 (21)
<i>D18S51</i>	15	18	+ 3 (20)
<i>D4S2408</i>	7	8	+ 1 (14)
<i>D17S1301</i>	8	9	+ 1 (13)
<i>D22S1045</i>	8	9	+ 1 (13)
<i>PentaE</i>	19	19	0
<i>PentaD</i>	14	14	0
<i>D20S482</i>	9	9	0
<i>CSF1PO</i>	8	8	0
<i>TPOX</i>	7	7	0
<i>D10S1248</i>	7	7	0
<i>TH01</i>	7	7	0
<i>D16S539</i>	7	7	0

* Вариабельность преимущественно обеспечена мутациями на фланках.

половины, имеют гетерозиготный генотип. Похожая картина наблюдалась для локусов *D9S1122* и *D13S317*, для которых увеличение гетерозиготности по сравнению с данными КЭ-генотипирования также было значительным (табл. 5).

Вероятность случайного совпадения генотипов двух неродственных индивидов (*MP*) снижалась для всех локусов, для которых были зарегистрированы изоаллельные варианты (кроме локуса *FGA*), что свидетельствует об увеличении идентификационной значимости результатов генотипирования, получаемых методом МПС. В наибольшей степени *MP* снижалась для локусов *D9S1122*, *D8S1179*, *D13S317* и *D21S11* — в 2.7 раза; в наименьшей степени — для локусов *D22S1045* и *D17S1301* (в 1.1 раз). Рассчитанная по данным МПС средняя вероятность того, что два случайно выбранных из популяции индивида будут иметь

один и тот же генотип по совокупности всех 27 STR-локусов, составила 2.89×10^{-35} (это означает, что случайное совпадение генотипа возможно с одним из 3.5×10^{34} человек). Этот результат на четыре порядка превышает значение, получаемое с использованием данных фрагментного анализа (1.43×10^{-31} , один из 7×10^{30} человек).

Информационная значимость данных МПС-генотипирования при установлении родства также значительно увеличивается по сравнению с данными КЭ, о чем свидетельствует рост значений вероятности исключения индивида по заданному генотипу (*PE*) и индексов родства (*TPI*) для локусов тест-системы. Так, *PE* увеличивалась в наибольшей степени для локуса *D4S2408* — в 2 раза, для локусов *D9S1122*, *D13S317*, *D5S818* и *D8S1179* — в 1.3–1.5 раза. Максимальный рост значений *TPI* зафиксирован для локусов *D12S391*

Таблица 3. Аллели с мутациями во фланкирующих последовательностях (N – количество аллелей в популяции)

Локус	Аллель		<i>N</i>	Локус	Аллель		<i>N</i>
<i>D5S818</i>	9a	[ATCT]9_rs73801920-A	1	<i>D13S317</i>	9б	[TATC]9_rs9546005-T	1
	10б	[ATCT]10_rs73801920-A	28		9в	[TATC]10_rs9546005-T	3
	11б	[ATCT]11_rs73801920-A	55		10в	[TATC]10_rs9546005-T, rs202043589-T	1
	12б	[ATCT]12_rs73801920-A	137		11а	[TATC]11_rs9546005-T	272
	12в	[ATCT]3 AGCT [ATCT]8_rs73801920-A	1		12б	[TATC]12_rs9546005-T	163
	13б	[ATCT]13_rs73801920-A	57		13б	[TATC]13_rs9546005-T	46
	14а	[ATCT]14_rs73801920-A	8		14б	[TATC]14_rs9546005-T	8
	15б	15_[ATCT]15_rs73801920-A	1		15а	[TATC]15_rs9546005-T	1
Локус	Аллель						<i>N</i>
<i>vWA</i>	14а	[TAGA]3 TGGA [TAGA]3 [CAGA]4 TAGA CAGA TAGA_rs75219269-G					127
	15б	TGGA [TAGA]3 TGGA [TAGA]3 [CAGA]4 TAGA CAGA TAGA_rs75219269-G					2
	16в	[TAGA]11 [CAGA]4 TAGA_rs199970098-A					1
	17д	[TAGA]12 [CAGA]4 TAGA_rs199970098-A					2
<i>D19S433</i>	13.2б	[CCTT]12 ccta CCTT cttt CCTT_rs745607776- delCT					1

Таблица 4. Новые аллели, обнаруженные в белорусской популяции

Локус	Аллель		Число	Покрытие
<i>D2S1338</i>	21г	D2S1338[CE21]-Chr2-GRCh37.p13 218879582-218879673 GGAG [GGAA]13 [GGCA]7	1	1509
<i>FGA</i>	23.2б	FGA[CE23.2]-Chr4-GRCh37.p13 155508888-155508975 [GGAA]2 GGAG AAAG AG [AAAG]14 AGAA AAAA [GAAA]3	1	1333
<i>D5S818</i>	15б	D5S818[CE15]-Chr5-GRCh37.p13 123111250-123111293 [ATCT]15 rs73801920-A	1	209
<i>D7S820</i>	11б	D7S820[CE11]-Chr7-GRCh37.p13 83789542-83789593 [TATC]2 TACC [TATC]8	1	140
<i>D12S391</i>	18.3б	D12S391[CE18.3]-Chr12-GRCh37.p13 12449954-12450029 AGAT GAT [AGAT]10 [AGAC]6 AGAT	3	>280
	23ж	D12S391[CE23]-Chr12-GRCh37.p13 12449954-12450029 [AGAT]16 [AGAC]6 AGAT	2	>200
	26б	D12S391[CE26]-Chr12-GRCh37.p13 12449954-12450029 [AGAT]15 [AGAC]11	1	331
<i>D18S51</i>	16б	D18S51[CE16]-Chr18-GRCh37.p13 60948900-60948971 AGAA AGCA [AGAA]14	1	403
<i>D19S433</i>	11б	D19S433[CE11]-Chr19-GRCh37.p13 30417142-30417205 [CCTT]9 cttt CCTT cttt CCTT	1	1375
	13б	D19S433[CE13]-Chr19-GRCh37.p13 30417142-30417205 ACTT [CCTT]10 ccta CCTT cttt CCTT	1	845
<i>D21S11</i>	29б	D21S11[CE29]-Chr21-GRCh37.p13 20554291-20554417 [TCTA]2 TATA [TCTA]3 [TCTG]5 [TCTA]3 ta [TCTA]3 tca [TCTA]2 tccata [TCTA]10	1	1056
	30в	D21S11[CE30]-Chr21-GRCh37.p13 20554291-20554417 [TCTA]6 [TCTG]5 [TCTA]3 ta [TCTA]2 tca [TCTA]2 tccata [TCTA]12	2	>500
	30ж	D21S11[CE30]-Chr21-GRCh37.p13 20554291-20554417 [TCTA]4 [TCTG]6 [TCTA]4 ta [TCTA]3 tca [TCTA]2 tccata [TCTA]11	1	1071

Таблица 5. Изменение уровня генетического полиморфизма и параметров информационной значимости ауто-сомных STR-локусов, исследованных методом МПС

Локус	<i>H_O</i>		<i>MP</i>		<i>PE</i>		<i>TPI</i>	
	КЭ	МПС	КЭ	МПС	КЭ	МПС	КЭ	МПС
<i>D1S1656</i>	0.889	0.896	0.020	0.016	0.773	0.787	4.51	4.81
<i>D2S441</i>	0.738	0.769	0.100	0.082	0.490	0.544	1.91	2.17
<i>D2S1338</i>	0.855	0.891	0.030	0.018	0.706	0.777	3.46	4.58
<i>D3S1358</i>	0.789	0.857	0.074	0.034	0.578	0.708	2.36	3.49
<i>D4S2408</i>	0.585	0.772	0.230	0.107	0.274	0.548	1.21	2.19
<i>FGA</i>	0.879	0.879	0.037	0.037	0.752	0.752	4.12	4.12
<i>D5S818</i>	0.724	0.808	0.120	0.060	0.467	0.613	1.81	2.60
<i>D6S1043</i>	0.849	0.850	0.049	0.048	0.692	0.695	3.30	3.33
<i>D7S820</i>	0.786	0.793	0.066	0.065	0.573	0.585	2.33	2.41
<i>D8S1179</i>	0.784	0.874	0.080	0.030	0.571	0.744	2.32	3.98
<i>D9S1122</i>	0.707	0.834	0.156	0.058	0.439	0.663	1.70	3.00
<i>vWA</i>	0.802	0.840	0.064	0.042	0.603	0.676	2.53	3.13
<i>D12S391</i>	0.898	0.951	0.024	0.010	0.791	0.900	4.89	10.18
<i>D13S317</i>	0.774	0.883	0.080	0.030	0.551	0.760	2.21	4.26
<i>D17S1301</i>	0.701	0.701	0.162	0.161	0.430	0.430	1.67	1.67
<i>D18S51</i>	0.847	0.847	0.032	0.031	0.689	0.689	3.27	3.27
<i>D19S433</i>	0.779	0.782	0.079	0.077	0.561	0.566	2.26	2.29
<i>D21S11</i>	0.872	0.919	0.040	0.015	0.738	0.835	3.89	6.20
<i>D22S1045</i>	0.724	0.724	0.110	0.109	0.467	0.467	1.81	1.81
<i>TPOX</i>	0.587	0.587	0.228	0.228	0.275	0.275	1.21	1.21
<i>CSFIPO</i>	0.741	0.741	0.115	0.115	0.494	0.494	1.93	1.93
<i>D10S1248</i>	0.768	0.768	0.101	0.101	0.541	0.541	2.16	2.16
<i>D20S482</i>	0.738	0.738	0.134	0.134	0.490	0.490	1.91	1.91
<i>TH01</i>	0.733	0.733	0.091	0.091	0.480	0.480	1.87	1.87
<i>PentaE</i>	0.898	0.898	0.020	0.020	0.791	0.791	4.91	4.91
<i>PentaD</i>	0.809	0.809	0.054	0.054	0.616	0.616	2.62	2.62
<i>D16S539</i>	0.745	0.745	0.101	0.101	0.501	0.501	1.96	1.96
Комбинированное значение			1.43×10^{-31}	2.89×10^{-35}			2.08×10^{10}	3.25×10^{12}

Примечание. Полужирным шрифтом выделены локусы, для которых не зафиксировано дополнительных МПС-аллелей.

(с 4.89 до 10.18) и *D21S11* (с 3.89 до 6.2), т.е. для локусов с наибольшим количеством зарегистрированных по данным МПС аллельных вариантов. Комбинированный индекс родства, получаемый с учетом наличия МПС-аллелей, достигал значения 3.25×10^{12} , что на два порядка выше значения, получаемого на основе данных фрагментного анализа — 2.08×10^{10} .

Анализ генетической подразделенности резидентного населения Республики Беларусь, проведенный методом молекулярной дисперсии (AMOVA) с учетом различий в частотах МПС-аллелей, не выявил статистически значимых генетических различий между исследованными региональными популяциями. Все население рес-

публики характеризуется общностью генного пула по изученным 27 аутосомным STR-маркерам. Анализ матриц парных расстояний также не позволил выявить статистически достоверные различия между парами популяционных выборок, сформированных по региональному признаку. Применительно к экспертному ДНК-анализу полученные данные указывают на возможность использования частотных характеристик 27 аутосомных локусов, установленных методом МПС, для всего населения Беларуси и формирования единой республиканской референсной базы данных.

Частоты аллелей аутосомных STR-локусов для населения Республики Беларусь по данным массового параллельного секвенирования приведены в

дополнительных материалах к настоящей статье и могут быть использованы для вероятностных расчетов при идентификации личности и установлении родства в криминалистике, а также в популяционно-генетических сравнительных исследованиях.

В рамках настоящего исследования с использованием технологии МПС и набора ForenSeq DNA Signature Prep Kit впервые у населения Республики Беларусь изучена внутренняя структура нуклеотидной последовательности 27 аутосомных STR-локусов. Проведена оценка соответствия результатов генотипирования, получаемых методом капиллярного электрофореза и массовым параллельным секвенированием. Показано, что генотипы PowerPlex® Fusion 6C и ForenSeq DNA Signature Prep Kit конкордантны для всех перекрывающихся локусов, за исключением *D7S820* — соответствие составило 99.96%. Вместе с тем следует отметить, что для отдельных образцов в некоторых локусах обнаружены ложные гомозиготные генотипы, один из аллелей в которых присутствовал, но не детектировался программным обеспечением ForenSeq UAS. В связи с этим при проведении исследования с использованием набора ForenSeq DNA Signature Prep Kit рекомендовано: 1) особое внимание обращать на результаты генотипирования локусов *D22S1045* и *D7S820*; также требуется осторожность в отношении локусов *D5S818*, *D1S1656*, *PentaE* и *PentaD*, особенно при исследовании малых количеств ДНК или ДНК плохого качества; 2) на основе анализа эмпирических данных определить минимальные пороговые уровни прочтения маркеров, преимущественно маркеров с высоким гетерозиготным дисбалансом; 3) установить оптимальные требования к качеству исследуемых образцов.

С учетом полиморфизма тандемных и фланкирующих участков исследованных локусов в белорусской популяции суммарно идентифицировано 216 дополнительных аллельных вариантов, 13 из которых обнаружены впервые. Для всех локусов рассчитаны частоты встречаемости аллелей и криминалистические параметры идентификационной информативности. Для имплементации новых сведений в экспертную практику сформирована референтная база данных частот аутосомных STR-локусов для населения Республики Беларусь по данным массового параллельного секвенирования.

Полученные в настоящей работе сведения предоставляют для экспертного сообщества Республики Беларусь возможность проведения вероятностной оценки результатов идентификации личности и установления родства, основанную на исследовании МПС-профилей ДНК, что обеспечит эффективное и корректное использование методов массового параллельного секвенирования в экспертной практике.

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. Животовский Л.А. Микросателлитная изменчивость в популяциях человека и методы ее изучения // Вестник ВОГиС. 2006. Т. 10. № 1. С. 74–96.
2. van der Gaag K.J., de Leeuw R.H., Hoogenboom J. et al. Massively parallel sequencing of short tandem repeats—Population data and mixture analysis results for the PowerSeq™ system // Forensic Sci. Intern.: Genetics. 2016. V. 24. P. 86–96. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.05.016>
3. Thermo Fisher Scientific [Электронный ресурс]. URL: <https://www.thermofisher.com/by/en/home.html> (дата обращения 03.04.2022).
4. Illumina. Sequencing and array-based solutions for genetic research [Электронный ресурс]. URL: <https://www.illumina.com/> (дата обращения 03.04.2022).
5. Цыбовский И.С., Веремейчик В.М., Котова С.А. и др. Создание судебной референтной базы данных по 18 аутосомным STR для ДНК-идентификации в Республике Беларусь // Генетика. 2017. Т. 53. № 2. С. 249–258.
6. Харьков В.Н., Котова С.А., Колесников Н.А. и др. Генетическое разнообразие 21 аутосомного STR-маркера системы CODIS в популяциях Восточной Европы // Генетика. 2021. Т. 57. № 12. С. 1396–1402.
7. STRbase 2.0 [Электронный ресурс]. URL: <https://strbase-b.nist.gov> (дата обращения 03.04.2022).
8. Chacon-Cortes D., Haupt L.M., Lea R.A. et al. Comparison of genomic DNA extraction techniques from whole blood samples: A time, cost and quality evaluation study // Mol. Biol. Rep. 2012. V. 39. № 5. P. 5961–5966. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1408-8>
9. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 478 с.
10. Verogen, ForenSeq™ DNA Signature Prep Reference Guide // Verogen proprietary. Document # VD2018005 Rev. A, 2018. 42 p.
11. GRCh37.p13: Genome Reference Consortium Human Build 37 patch release 13 [Электронный ресурс]. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_0000014-05.25 (дата обращения 03.02.2021).
12. Parson W., Ballard D., Budowle B. et al. Massively parallel sequencing of forensic STRs: Considerations of the DNA commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG) on minimal nomenclature requirements // Forensic Sci. Intern.: Genetics. 2016.

- V. 22. P. 54–63.
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.01.009>
13. *Devesse L., Ballard D., Davenport L. et al.* Concordance of the ForenSeq™ system and characterisation of sequence-specific autosomal STR alleles across two major population groups // *Forensic Sci. Intern.: Genetics*. 2018. V. 34. P. 57–61.
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.10.012>
 14. GeneAIEx 6.5: Genetic Analysis in Excel [Электронный ресурс]. URL: <https://biology-assets.anu.edu.au/GeneAIEx/Welcome.html> (дата обращения 15.11.2021).
 15. *Ristow P.G., D'Amato M.E.* Forensic statistics analysis toolbox (FORSTAT): A streamlined workflow for forensic statistics // *Forensic Sci. Intern.: Genetics Suppl. Series 6*. 2017. V. 6. P. e52–e54.
<https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2017.09.006>
 16. Arlequin: An Integrated Software for Population Genetics Data Analysis [Электронный ресурс]. URL: <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3> (дата обращения 02.10.2018).
 17. *Hussing C., Huber C., Bytyci R. et al.* Sequencing of 231 forensic genetic markers using the MiSeq FGx™ forensic genomics system – an evaluation of the assay and software // *Forensic Sci. Research*. 2018. V. 3. №. 2. P. 111–123.
<https://doi.org/10.1080/20961790.2018.1446672>
 18. *Dai W., Pan Y., Sun X. et al.* High polymorphism detected by massively parallel sequencing of autosomal STRs using old blood samples from a Chinese Han population // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 1–7.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-55282-9>
 19. *Hözl-Müller P., Bodner M., Berger B. et al.* Exploring STR sequencing for forensic DNA intelligence databasing using the Austrian National DNA Database as an example // *Int. J. Legal Med.* 2021. V. 135. P. 2235–2246.
<https://doi.org/10.1007/s00414-021-02685-x>
 20. The Evaluation of Forensic DNA Evidence. Committee on DNA Forensic Science: an update. Washington (D.C.): Natl Acad. Press, 1996. 272 p.
<https://doi.org/10.17226/5141>
 21. *Gettings K.B., Aponte R.A., Vallone P.M. et al.* STR allele sequence variation: Current knowledge and future issues // *Forensic Sci. Intern.: Genetics*. 2015. V. 18. P. 118–130.
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.06.005>
 22. *Gettings K.B., Borsuka L.A., Steffen C.R. et al.* Sequence-based U.S. population data for 27 autosomal STR loci // *Forensic Sci. Intern.: Genetics*. 2018. V. 37. P. 106–115.
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.07.013>
 23. *Simayijiang H., Morling N., Børsting C.* Sequencing of human identification markers in an Uyghur population using the MiSeq FGx™ Forensic Genomics System // *Forensic Sci. Research*. 2020. P. 1–9.
<https://doi.org/10.1080/20961790.2020.1779967>
 24. *Gettings K.B., Borsuk L.A., Ballard D. et al.* STRSeq: A catalog of sequence diversity at human identification Short Tandem Repeat loci // *Forensic Sci. Intern.: Genetics*. 2017. V. 31. P. 111–117.
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.08.017>

Variability of 27 Autosomal STR Loci for the Population of the Republic of Belarus Based on the Mass Parallel Sequencing Data

S. A. Kotova^{a, *}, N. S. Parfionava^a, T. V. Zabauskaya^a,
 V. I. Rybakova^a, A. A. Spivak^a, S. A. Paliavoi^b, and A. V. Lugovnev^c

^aScientific and Practical Center of the State Forensic Examination Committee
 of the Republic of Belarus, Minsk, 220114 Republic of Belarus

^bMasaryk University, Brno, 60177 Czech Republic

^cState Forensic Examination Committee of the Republic
 of Belarus, Minsk, 220073 Republic of Belarus

*e-mail: svetlkotova@mail.ru

Variability of 27 autosomal STR loci of the ForenSeq DNA Signature Prep Kit (Illumina) commercial panel was studied using the technology of mass parallel sequencing (MPS) in 733 unrelated individuals representing the population of the Republic of Belarus as well as a population base of MPS allele frequencies for expert probabilistic calculations in human identification and paternity establishment was evaluated. The agreement between genotypes obtained by MPS and capillary electrophoresis (CE) was 99.96%. The number of MPS alleles increased more than two times for eight loci (*D12S391*, *D21S11*, *D2S1338*, *vWA*, *D3S1358*, *D8S1179*, *D13S317*, *D9S1122*). Thirteen alleles detected were not included in the STRSeq BioProject catalog of the international online database STRbase 2.0. The random match probability of 27-locus MPS profiles decreased from 1.43×10^{-31} to 2.89×10^{-35} , and the combined paternity index increased from 2.08×10^{10} to 3.25×10^{12} compared to CE data.

Keywords: autosomal STR locus, variability, isometric alleles, massively parallel sequencing.