

Научный рецензируемый журнал

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.

Периодичность 8 выпусков в год

Учредители

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Межрегиональная общественная организация Вавиловское общество генетиков и селекционеров

Сибирское отделение Российской академии наук

Главный редактор

В.К. Шумный – академик РАН, д-р биол. наук, профессор (Россия)

Заместители главного редактора

Н.А. Колчанов – академик РАН, д-р биол. наук, профессор (Россия)

Н.Б. Рубцов – д-р биол. наук, профессор (Россия)

Е.К. Хлесткина – д-р биол. наук, профессор (Россия)

Ответственный секретарь

Г.В. Орлова – канд. биол. наук (Россия)

Редакционный совет

В.С. Баранов – чл.-кор. РАН, д-р мед. наук (Россия)
Л.А. Беспалова – академик РАН, д-р с.-х. наук (Россия)
А. Бёрнер – д-р наук (Германия)
В.М. Говорун – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
И. Гроссе – д-р наук, проф. (Германия)
Г.Л. Дианов – д-р биол. наук, проф. (Великобритания)
Ю.Е. Дуброва – д-р биол. наук, проф. (Великобритания)
И.К. Захаров – д-р биол. наук, проф. (Россия)
И.А. Захаров-Гезехус – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)
С.Г. Инге-Вечтомов – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
И.Е. Керкис – д-р наук (Бразилия)
А.В. Кильчевский – чл.-кор. НАНБ, д-р биол. наук (Беларусь)
С.В. Костров – чл.-кор. РАН, д-р хим. наук (Россия)
Ж. Ле Гуи – д-р наук (Франция)
Б. Люгтенберг – д-р наук, проф. (Нидерланды)
В.И. Молодин – академик РАН, д-р ист. наук (Россия)
В.П. Пузырев – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)
А.Ю. Ржецкий – канд. биол. наук, проф. (США)
И.Б. Рогозин – канд. биол. наук (США)
А.О. Рувинский – д-р биол. наук, проф. (Австралия)
К.Г. Скрябин – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
К.В. Славин – д-р наук, проф. (США)
И.А. Тихонович – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
Л.В. Хотылева – академик НАНБ, д-р биол. наук (Беларусь)
Э.К. Хуснутдинова – д-р биол. наук, проф. (Россия)
М.Ф. Чернов – д-р мед. наук (Япония)
С.В. Шестаков – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
Н.К. Янковский – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

Редакционная коллегия

Т.Г. Амстиславская – д-р биол. наук (Россия)
Е.Е. Андронов – канд. биол. наук (Россия)
Ю.С. Аульченко – д-р биол. наук (Россия)
Д.А. Афонников – канд. биол. наук, доцент (Россия)
Л.И. Афтanas – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)
Е.В. Березиков – канд. биол. наук, проф. (Россия, Нидерланды)
С.А. Боринская – д-р биол. наук (Россия)
П.М. Бородин – д-р биол. наук, проф. (Россия)
М.И. Воевода – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)
Т.А. Гавриленко – д-р биол. наук (Россия)
В.Н. Даниленко – д-р биол. наук, проф. (Россия)
С.А. Демаков – д-р биол. наук (Россия)
Е.А. Долгих – д-р биол. наук (Россия)
Н.Н. Дыгало – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)
С.Л. Киселев – д-р биол. наук, проф. (Россия)
В.А. Козлов – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)
Ю.М. Константинов – д-р биол. наук, проф. (Россия)
А.В. Кочетов – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)
О. Кребс – д-р биол. наук, проф. (Германия)
И.Н. Лаврик – канд. хим. наук (Германия)
Л.А. Лутова – д-р биол. наук, проф. (Россия)
В.Ю. Макеев – чл.-кор. РАН, д-р физ.-мат. наук (Россия)
М.П. Мошкин – д-р биол. наук, проф. (Россия)
Н.А. Проворов – д-р биол. наук, проф. (Россия)
Д.В. Пышный – чл.-кор. РАН, д-р хим. наук (Россия)
А.В. Ратушный – канд. биол. наук (США)
Е.А. Салина – д-р биол. наук, проф. (Россия)
М.Г. Самсонова – д-р биол. наук (Россия)
В.А. Степанов – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii

Founded in 1997

Published 8 times annually

Founders

Federal State Budget Scientific Institution "The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences"

The Vavilov Society of Geneticists and Breeders

Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

Editor-in-Chief

V.K. Shumny, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia

Deputy Editor-in-Chief

N.A. Kolchanov, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia

N.B. Rubtsov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

E.K. Khlestkina, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

Executive Secretary

G.V. Orlova, Cand. Sci. (Biology), Russia

Editorial council

V.S. Baranov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia

L.A. Beshpalova, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Agricul.), Russia

A. Börner, Dr. Sci., Germany

M.F. Chernov, Dr. Sci. (Medicine), Japan

G.L. Dianov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Great Britain

Yu.E. Dubrova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Great Britain

V.M. Govorun, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

J. Le Gouis, Dr. Sci., France

I. Grosse, Professor, Dr. Sci., Germany

S.G. Inge-Vechtomov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

I.E. Kerkis, Dr. Sci., Brazil

L.V. Khotyleva, Full Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Biology), Belarus

E.K. Khushnutdinova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

A.V. Kilchevsky, Corr. Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Biology), Belarus

S.V. Kostrov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry), Russia

B. Lugtenberg, Professor, Dr. Sci., Netherlands

V.I. Molodin, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (History), Russia

V.P. Puzyrev, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia

I.B. Rogozin, Cand. Sci. (Biology), United States

A.O. Ruvinsky, Professor, Dr. Sci. (Biology), Australia

A.Yu. Rzhetsky, Professor, Cand. Sci. (Biology), United States

S.V. Shestakov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

K.G. Skryabin, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

K.V. Slavin, Professor, Dr. Sci., United States

I.A. Tikhonovich, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

N.K. Yankovsky, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

I.K. Zakharov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

I.A. Zakharov-Gezekhus, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

Editorial board

D.A. Afonnikov, Associate Professor, Cand. Sci. (Biology), Russia

L.I. Aftanas, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia

T.G. Amstislavskaya, Dr. Sci. (Biology), Russia

E.E. Andronov, Cand. Sci. (Biology), Russia

Yu.S. Aulchenko, Dr. Sci. (Biology), Russia

E.V. Berezikov, Professor, Cand. Sci. (Biology), Russia, Netherlands

S.A. Borinskaya, Dr. Sci. (Biology), Russia

P.M. Borodin, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

V.N. Danilenko, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

S.A. Demakov, Dr. Sci. (Biology), Russia

E.A. Dolgikh, Dr. Sci. (Biology), Russia

N.N. Dygalo, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

T.A. Gavrilenko, Dr. Sci. (Biology), Russia

S.L. Kiselev, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

A.V. Kochetov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

Yu.M. Konstantinov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

V.A. Kozlov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia

O. Krebs, Professor, Dr. Sci. (Biology), Germany

I.N. Lavrik, Cand. Sci. (Chemistry), Germany

L.A. Lutova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

V.Yu. Makeev, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Physics and Mathem.), Russia

M.P. Moshkin, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

N.A. Provorov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

D.V. Pyshnyi, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry), Russia

A.V. Ratushny, Cand. Sci. (Biology), United States

E.A. Salina, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

M.G. Samsonova, Dr. Sci. (Biology), Russia

V.A. Stepanov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

M.I. Voevoda, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia

167

ОТ РЕДАКТОРА

Клеточная и молекулярная биология

168

ОБЗОР

Церебральные органоиды – перспективная модель в клеточных технологиях

Т.А. Шнайдер

179

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Поиск микроРНК, потенциально задействованных в поддержании самообновления плюрипотентных клеток лабораторной крысы

В.В. Шерстюк, С.П. Медведев, М.Т. Ри, Ю.В. Вяткин, О.В. Сайк, Д.Н. Штокало, С.М. Закиян

187

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Исследование функциональности получаемых из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток кардиомиоцитов для моделирования сердечных аритмий при синдроме удлинённого интервала QT

М.М. Слотвицкий, В.А. Цвеляя, Ш.Р. Фролова, Е.В. Дементьева, К.И. Агладзе

196

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Дифференциальный протеомный анализ корней гороха на ранних этапах развития симбиоза с клубеньковыми бактериями

И.В. Леппянен, А.Н. Кириенко, А.А. Лобов, Е.А. Долгих

Популяционная генетика

205

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Полиморфизм генов *CYP1A1* и *CYP2D6* в популяциях бурят, телеутов и у русских Восточной Сибири

Л.Э. Табиханова, Л.П. Осипова, Т.В. Чуркина, Е.Н. Воронина, М.Л. Филипенко

212

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Полиморфизм *T3111C* гена *Clock* у женщин русской и бурятской национальности

О.В. Калужная, Н.В. Семенова, Т.А. Бацрова, И.М. Мадаева, Е.В. Беляева, Л.И. Колесникова

217

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Выявление генов, вовлечённых в контроль белой окраски головы, у восьми российских пород крупного рогатого скота

Н.С. Юдин, Н.М. Белоногова, Д.М. Ларкин

224

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Идентификация и генетическая характеристика этиологического агента пироплазмидоза лошадей на территории Западной и Восточной Сибири

В.А. Рар, В.А. Марченко, Е.А. Ефремова, О.В. Сунцова, О.В. Лисак, А.Ю. Тикунов, И.В. Мельцов, Н.В. Тикунова

Физиологическая генетика

230

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Исследование экспрессии генов рецептора глюкокортикоидов и микроРНК в гиппокампе и концентрации кортизола в крови у лисиц, селекционируемых по реакции на человека

В.Ю. Овчинников, Е.В. Антонов, Г.В. Васильев, С.Г. Шихевич, Д.В. Шепелева, Ю.Э. Гербек

235

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Влияние ингибитора гликолиза (2-ДГ) и разобщителя окисления и фосфорилирования (2,4-ДНФ) на метаболиты головного мозга

О.Б. Шевелев, М.П. Мошкин

240

ОБЗОР

Антисмысловые олигонуклеотиды для исследований механизмов гипертонической болезни и ее терапии

Л.О. Климов, А.А. Серяпина, В.Ф. Зарытова, А.С. Левина, А.Л. Маркель

248

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Тканеспецифичные эффекты бенз[а]пирена и ДДТ на профиль экспрессии микроРНК у самок крыс

Д.С. Ушаков, Т.С. Калинина, А.С. Дорожкова, В.Ю. Овчинников, Л.Ф. Гуляева

256

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Влияние биологически активного препарата Флоравит® на строение кожи и волоса у соболей (*Martes zibellina*)

Н.Н. Лоечко, И.Е. Чернова, Т.С. Куницына

261

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Изменение экспрессии актин-связывающих белков в почке при дегидратации

И.И. Хегай

265

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Мутация *yellow* в локусе *agouti* устраняет возрастное повышение экспрессии генов белков, регулирующих окисление жирных кислот в мышцах у мышей

Ю.В. Пискунова, А.Ю. Казанцева, А.В. Бакланов,
Н.М. Бажан

273

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Гомологи гена *rolC* природно-трансгенных льнянок *Linaria vulgaris* и *Linaria cretica* экспрессируются *in vitro*

Т.В. Матвеева, О.Д. Богомаз, Л.А. Голованова,
Ю.С. Ли, Д. Димитров

Биоресурсные коллекции

279

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Протокол работы с информационной системой по биоресурсным коллекциям институтов ФАНО России на примере коллекции микроорганизмов

Ф.В. Казанцев, А.А. Смирнова, А.С. Розанов,
Ю.Е. Уварова, Д.А. Афонников, С.Е. Пельтек,
С.А. Лашин

Генетика растений

285

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Таксономическая оценка видов рода *Oxytropis* из Юго-Восточного Казахстана

Ш.С. Альмерекова, С.И. Абузалиева,
Н.М. Мухитдинов

167 FROM THE EDITOR

Cell and molecular biology

168 REVIEW
Cerebral organoids: a promising model in cellular technologies
T.A. Shnaider

179 ORIGINAL ARTICLE
The search for microRNAs potentially involved in the self-renewal maintaining of laboratory rat pluripotent stem cells
V.V. Sherstyuk, S.P. Medvedev, M.T. Ri, Y.V. Vyatkin, O.V. Saik, D.N. Shtokalo, S.M. Zakian

187 ORIGINAL ARTICLE
The study of the functionality of cardiomyocytes obtained from induced pluripotent stem cells for the modeling of cardiac arrhythmias based on long QT syndrome
M.M. Slotvitsky, V.A. Tsvelaya, S.R. Frolova, E.V. Dement'eva, K.I. Agladze

196 ORIGINAL ARTICLE
Differential proteome analysis of pea roots at the early stages of symbiosis with nodule bacteria
I.V. Leppyanen, A.N. Kirienko, A.A. Lobov, E.A. Dolgikh

Population genetics

205 ORIGINAL ARTICLE
Genetic polymorphism of *CYP1A1* and *CYP2D6* in populations of Buryats, Teleuts and Russians of Eastern Siberia
L.E. Tabikhanova, L.P. Osipova, T.V. Churkina, E.N. Voronina, M.L. Filipenko

212 ORIGINAL ARTICLE
Polymorphism *T3111C* of the *Clock* gene in ethnic groups of women from Russia and Buryatia
O.V. Kaluzhnaya, N.V. Semenova, T.A. Bairova, I.M. Madaeva, E.V. Belyaeva, L.I. Kolesnikova

217 ORIGINAL ARTICLE
Genes related to the white face colour pattern in eight Russian cattle breeds
N.S. Yudin, N.M. Belonogova, D.M. Larkin

224 ORIGINAL ARTICLE
Identification of the etiological agent of equine piroplasmiasis in Western and Eastern Siberia
V.A. Rar, V.A. Marchenko, E.A. Efremova, O.V. Suntsova, O.V. Lisak, A.Y. Tikunov, I.V. Meltsov, N.V. Tikunova

Physiological genetics

230 ORIGINAL ARTICLE
Hippocampal glucocorticoid receptor and microRNA gene expression and serum cortisol concentration in foxes selected for behavior toward humans
V.Yu. Ovchinnikov, E.V. Antonov, G.V. Vasilyev, S.G. Shihevich, D.V. Shepeleva, Yu.E. Herbeck

235 ORIGINAL ARTICLE
Impact of glycolysis inhibitor (2-DG) and oxidation and phosphorylation uncoupler (2,4-DNP) on brain metabolites
O.B. Shevelev, M.P. Moshkin

240 REVIEW
Antisense oligonucleotides for the arterial hypertension mechanisms study and therapy
L.O. Klimov, A.A. Seryapina, V.F. Zarytova, A.S. Levina, A.L. Markel

248 ORIGINAL ARTICLE
Tissue-specific effects of benzo[a]pyrene and DDT on microRNA expression profile in female rats
D.S. Ushakov, T.S. Kalinina, A.S. Dorozhkova, V.Y. Ovchinnikov, L.F. Gulyaeva

256 ORIGINAL ARTICLE
Influence of the biologically active dietary supplement Floravit® on the skin and hair structure in sable (*Martes zibellina*)
N.N. Loenko, I.E. Chernova, T.S. Kunitsina

261 ORIGINAL ARTICLE
Changing of expression actin-binding proteins in the kidney under dehydration
I.I. Khegay

265

ORIGINAL ARTICLE

Mutation *yellow* in *agouti* loci prevents age-related increase of skeletal muscle genes regulating free fatty acids oxidation

Y.V. Piskunova, A.Y. Kazantseva, A.V. Baklanov, N.M. Bazhan

273

ORIGINAL ARTICLE

Homologs of the *rolC* gene of naturally transgenic toadflaxes *Linaria vulgaris* and *Linaria cretica* are expressed *in vitro*

T.V. Matveeva, O.D. Bogomaz, L.A. Golovanova, Yu.S. Li, D. Dimitrov

Bioresource collections

279

ORIGINAL ARTICLE

Information system on microbial collections as a part of bioresource collections portal for Russia's FASO organizations: a working protocol

F.V. Kazantsev, A.A. Smirnova, A.S. Rozanov, Yu.E. Uvarova, D.A. Afonnikov, S.E. Peltek, S.A. Lashin

Plant genetics

285

ORIGINAL ARTICLE

Taxonomic assessment of the *Oxytropis* species from South-East of Kazakhstan

S. Almerekova, S. Abugalieva, N. Mukhitdinov

Уважаемые читатели Вавиловского журнала генетики и селекции!

Настоящий номер журнала включает несколько разделов, посвященных актуальным направлениям молекулярной и клеточной биологии, популяционной, физиологической генетики и генетики растений.

Раздел «Клеточная и молекулярная биология» открывает обзор, в котором описана разработка модельной системы церебральных органоидов, позволяющей реконструировать трехмерную архитектуру отделов головного мозга и исследовать этапы нейрогенеза человека. Благодаря данной технологии появилась возможность изучения патологических изменений головного мозга, вызванных хромосомными или инфекционными заболеваниями. Следующие две статьи посвящены плюрипотентным стволовым клеткам и их использованию в качестве моделей для изучения заболеваний. Раздел включает экспериментальную работу, в которой представлен анализ протеомного спектра корней гороха для выявления новых регуляторных механизмов симбиоза с клубеньковыми бактериями.

Несколько экспериментальных статей составляют раздел «Популяционная генетика». В первой работе описаны результаты изучения генных локусов, входящих в систему биотрансформации ксенобиотиков у человека и животных. На примере двух ключевых генов суперсемейства цитохрома P-450 продемонстрированы значительные различия в частоте аллелей в популяциях русских, телеутов, бурят и их метисов, проживающих на территории Восточной Сибири. Полученные различия позволяют прогнозировать риск развития онкологических заболеваний, вызванных загрязнением внешней среды, и оценить побочные эффекты лекарственных препаратов в группах населения, принадлежащих к разным национальностям. В следующей

статье представлены результаты изучения распространенности аллелей гена циркадного ритма. Установлено, что различия в частотах аллелей гена в популяциях женщин бурятской и русской национальности могут приводить к десинхронизации биологических часов и нарушению сна. Другое исследование раздела связано с идентификацией генов, контролирующих белую окраску головы, у российских пород крупного рогатого скота. Работа выполнена с применением современных технологий полногеномного генотипирования; выявлен ряд потенциальных локусов, которые могут участвовать в формировании данного признака. В статье, завершающей раздел, приведены результаты популяционного анализа возбудителей пироплазмидоза лошадей на территории Западной и Восточной Сибири и показаны различия по степени инфицированности животных в разных областях.

Раздел «Физиологическая генетика» включает обзорную статью и ряд экспериментальных исследований. Обзор посвящен достоинствам и проблемам использования антисмысловых олигонуклеотидов для терапии артериальной гипертонии; роли микроРНК в качестве мишени для олигонуклеотидов. В двух экспериментальных работах показана роль микроРНК в регуляции поведения, формировании памяти и ответа на стресс. В одной из них на модели доместикации, серебристо-черной лисиче, продемонстрировано участие микроРНК в регуляции стресс-ответа; в другой – ее роль в процессах злокачественной трансформации клеток животных. Важные результаты представлены в работе по изучению влияния ингибиторов гликолиза, окисления и фосфорилирования на метаболические процессы головного мозга. Еще две статьи раздела посвящены изучению экспрессии ключевых белков, регулирующих углеводно-жировой обмен, и белковых компонентов цитоскелета почки в условиях ограничения потребления воды. Авторы следующей работы исследовали влияние биологически активной добавки на строение кожно-волосного покрова у соболей и показали его положительный эффект на адаптацию к факторам внешней среды. Завершает раздел работа по изучению экспрессии гомологов генов Т-ДНК в геноме природно-трансгенных льянок.

В разделе «Биоресурсные коллекции» представлена информация о создании портала коллекций микроорганизмов и принципы работы с ним.

Молекулярно-генетическое исследование видов рода *Oxytropis* для выяснения их филогенетических взаимоотношений и степени распространенности на территории Казахстана включено в раздел «Генетика растений».

Академик В.К. Шумный

Церебральные органоиды – перспективная модель в клеточных технологиях

Т.А. Шнайдер

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Развитие головного мозга человека представляет собой сложный многоэтапный процесс, включающий образование различных типов нейральных клеток и их взаимодействия. Многие фундаментальные механизмы нейрогенеза установлены благодаря изучению модельных животных. Однако значительные структурные различия головного мозга по сравнению с другими животными не позволяют рассмотреть все аспекты формирования головного мозга у человека, которые могут играть решающую роль для развития его уникальных когнитивных способностей. Новая технология трехмерных церебральных органоидов открывает исследователям уникальную возможность моделировать ранние этапы нейрогенеза человека. В обзоре рассматриваются технология получения трехмерных церебральных органоидов, примеры ее успешного внедрения в фундаментальные и прикладные исследования, имеющиеся проблемы, а также перспективы ее развития.

Ключевые слова: нейрогенез; церебральные органоиды; клеточные технологии.

Cerebral organoids: a promising model in cellular technologies

T.A. Shnaider

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

The development of the human brain is a complex multi-stage process including the formation of various types of neural cells and their interactions. Many fundamental mechanisms of neurogenesis have been established due to the studying of model animals. However, significant differences in the brain structure compared to other animals do not allow considering all aspects of the human brain formation, which could play the main role in the development of unique cognitive abilities for human. Four years ago, Lancaster's group elaborated human pluripotent stem cell-derived three-dimensional cerebral organoid technology, which opened a unique opportunity for researchers to model early stages of human neurogenesis *in vitro*. Cerebral organoids closely remodel many endogenous brain regions with specific cell composition like ventricular zone with radial glia, choroid plexus, and cortical plate with upper and deeper-layer neurons. Moreover, human brain development includes interactions between different brain regions. Generation of hybrid three-dimensional cerebral organoids with different brain region identity allows remodeling some of them, including long-distance neuronal migration or formation of major axonal tracts. In this review, we consider the technology of obtaining human pluripotent stem cell-derived three-dimensional cerebral organoids with different modifications and with different brain region identity. In addition, we discuss successful implementation of this technology in fundamental and applied research like modeling of different neurodevelopmental disorders and drug screening. Finally, we regard existing problems and prospects for development of human pluripotent stem cell-derived three-dimensional cerebral organoid technology.

Key words: neurogenesis; cerebral organoids; cellular technologies.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Шнайдер Т.А. Церебральные органоиды – перспективная модель в клеточных технологиях. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(2):168-178. DOI 10.18699/VJ18.344

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Shnaider T.A. Cerebral organoids: a promising model in cellular technologies. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(2):168-178. DOI 10.18699/VJ18.344 (in Russian)

Человеческий мозг – один из самых сложно устроенных органов у всех животных. Он имеет уникальную клеточную архитектуру и выполняет множество различных функциональных задач. Неудивительно, что исследователей давно интересовали процессы его развития, становления и функционирования, однако недоступность органа для различных экспериментальных манипуляций всегда препятствовала прогрессу в этой области. Многие выдающиеся результаты были получены на модельных животных, прежде всего грызунах и человекообразных обезьянах. Однако значительные различия в строении головного мозга человека и других млекопитающих не позволяют исследовать многие нейробиологические вопросы и проблемы. Стремительное развитие методов клеточной биологии дало возможность реконструировать некоторые аспекты пространственной организации нервной ткани человека и процесса ее дифференцировки. Одним из самых выдающихся достижений последних лет является разработка системы церебральных органоидов (ЦО), позволяющая реконструировать трехмерную цитоархитектонику некоторых отделов головного мозга (Lancaster et al., 2013). Технология ЦО предоставляет абсолютно уникальную возможность воссоздавать начальные этапы развития головного мозга человека и исследовать поведение нервных клеток в условиях, максимально приближенных к *in vivo*. Особую ценность ЦО представляют для изучения патологических изменений фетального головного мозга, вызванных различными хромосомными (Bershteyn et al., 2017; Iefremova et al., 2017) или инфекционными заболеваниями (Qian et al., 2016). Установление молекулярно-генетических и клеточных патологических механизмов многих болезней на модели ЦО может помочь в разработке потенциальных лекарственных препаратов (Li C. et al., 2017) и в конечном итоге служить уникальной системой для их тестирования (Zhou et al., 2017).

Ранние этапы развития головного мозга человека *in vivo*

Человеческий мозг содержит десятки миллионов различных нейронов и глиальных клеток, которые путем сложных взаимодействий обеспечивают его уникальные функции. Такая сложность организации органа проявляется в процессе его развития, который занимает большую часть эмбрионального, а также значительную часть постнатального онтогенеза (Malik et al., 2013). По сравнению с другими группами млекопитающих, прежде всего с ближайшими предками – приматами, относительный размер мозга человека сильно увеличен, а процесс его развития занимает более продолжительный период времени (Geschwind, Rakic, 2013).

Развитие человеческого мозга начинается с формирования из эктодермы зачатка всей центральной нервной системы – нервной пластинки, состоящей из нейроэпителиальных клеток (НЭК), которые дают начало всему разнообразию клеточного состава головного мозга (Götz, Huttner, 2005). Одно из первых и наиболее важных изменений, которое претерпевает нервная пластинка, – ее смыкание с образованием нервной трубки. Впоследствии из сформировавшейся внутри полости будут развиваться желудочки головного мозга. Как и нервная пластинка,

нервная трубка состоит из НЭК, которые представляют собой псевдомногослойный эпителий (рис. 1).

Группа клеток, непосредственно контактирующих с желудочком, называется вентрикулярной зоной (ВЗ). Их пролиферация осуществляется путем симметричного пролиферативного деления (веретено деления ориентировано горизонтально), в результате которого клеточное потомство представляет собой две идентичные НЭК. При таком способе деления увеличивается численность клеточной популяции и происходит пространственное расширение области нейроэпителия. Перед самым началом нейрогенеза НЭК претерпевают некоторые изменения и трансформируются в клетки радиальной глии (РГ), из которой формируются практически все типы нейронов головного мозга (Anthony et al., 2004). Моментом начала нейрогенеза считается возникновение первых нейронов, которые появляются у человека на 5-й – 6-й гестационной неделе (Howard et al., 2008). Их появление вызвано переходом РГ от симметричного пролиферативного деления к асимметричному (веретено деления ориентировано вертикально). При таком типе деления дочерние клетки представлены одной клеткой РГ и одним нейроном или его предшественником (Lancaster, Knoblich, 2012). Образовавшиеся клетки-предшественники теряют свои эпителиальные свойства и мигрируют из ВЗ в направлении базальной стороны нейроэпителия, формируя слой, который называется субвентрикулярной зоной (СВЗ). Отличить данный слой от ВЗ можно по ориентации клеток и экспрессии специфических молекулярных маркеров (Smart et al., 2002; Howard et al., 2008). Клетки-предшественники СВЗ называются промежуточными предшественниками (ПП), поскольку представляют собой переходную стадию между РГ и нейронами (Haubensak et al., 2004; Miyata et al., 2004). Помимо этой группы клеток, которая у человека, по сравнению с другими животными, сильно увеличена (Smart et al., 2002), в СВЗ располагается другой тип клеток-предшественников – базальная радиальная глия (БРГ) (Fietz et al., 2010). Они образуются также путем деления РГ и переходят к асимметричным делениям, для того чтобы производить нейроны и пополнять свой собственный пул. Тем не менее наличие в СВЗ двух четко делимых популяций клеток-предшественников остается спорным вопросом, поскольку сейчас появляется все больше доказательств того, что ПП и БРГ могут флукутировать в морфологических характеристиках и пролиферативном потенциале (Betizeau et al., 2013). Процесс раннего нейрогенеза заканчивается тем, что все типы нейральных предшественников делятся симметрично и дают начало нейронам, которые мигрируют в сторону базальной мембраны, используя для своего движения отростки радиальной глии. Последовательное появление нейронов глубоких слоев, а затем верхних слоев приводит к формированию шестислойной кортикальной пластинки (КП). Далее наступают поздние этапы нейрогенеза, включающие процессы астроглиогенеза, олигодендрогенеза и васкуляризации.

Получение ЦО

Первые успешные попытки культивирования в условиях *in vitro* клеток живых организмов предприняты более ста лет назад (Harrison, 1906). Для нейробиологии развитие

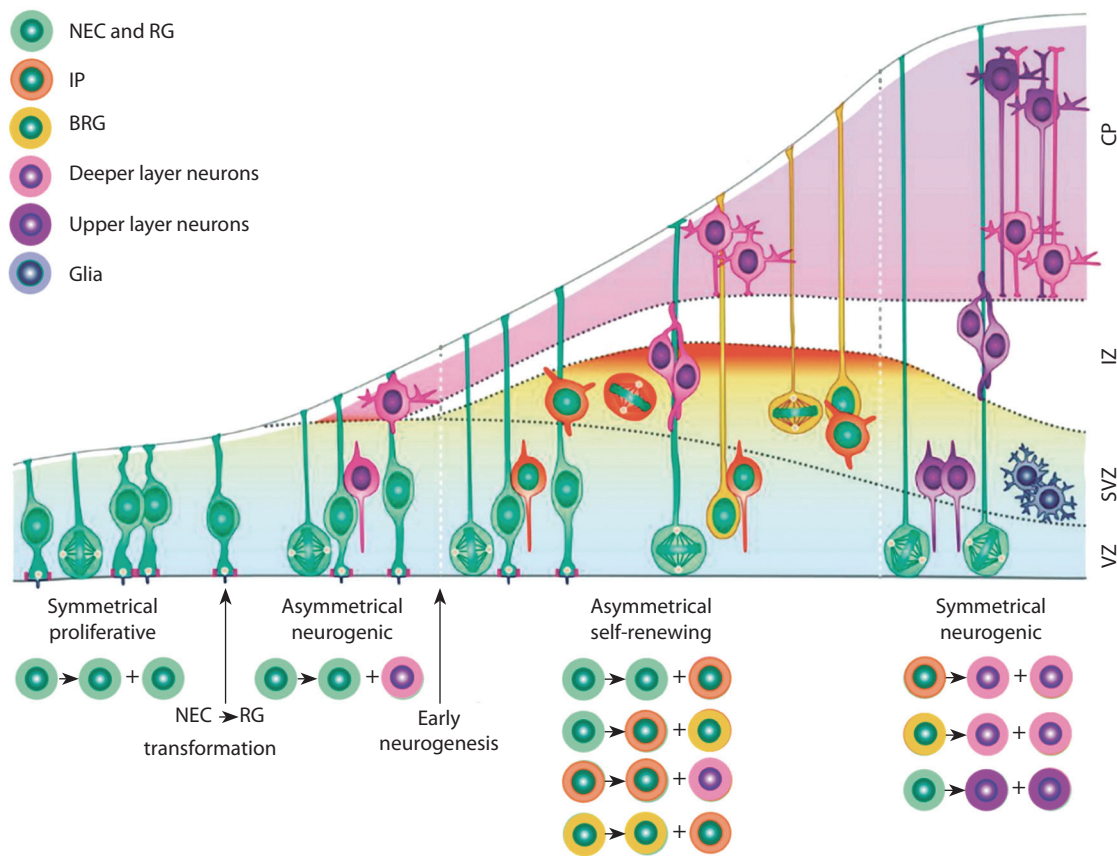


Fig. 1. Early stages of human neurogenesis (simplified). The main types of neural precursor cells and their progeny. Types of division for each cell type are shown according to (Paridaen and Huttner, 2014), with modifications. NEC, neuroepithelial cells; RG, radial glia; IP, intermediate progenitors; BRG, basal radial glia; VZ, ventricular zone; SVZ, subventricular zone; IZ, intermediate zone; CP, cortical plate.

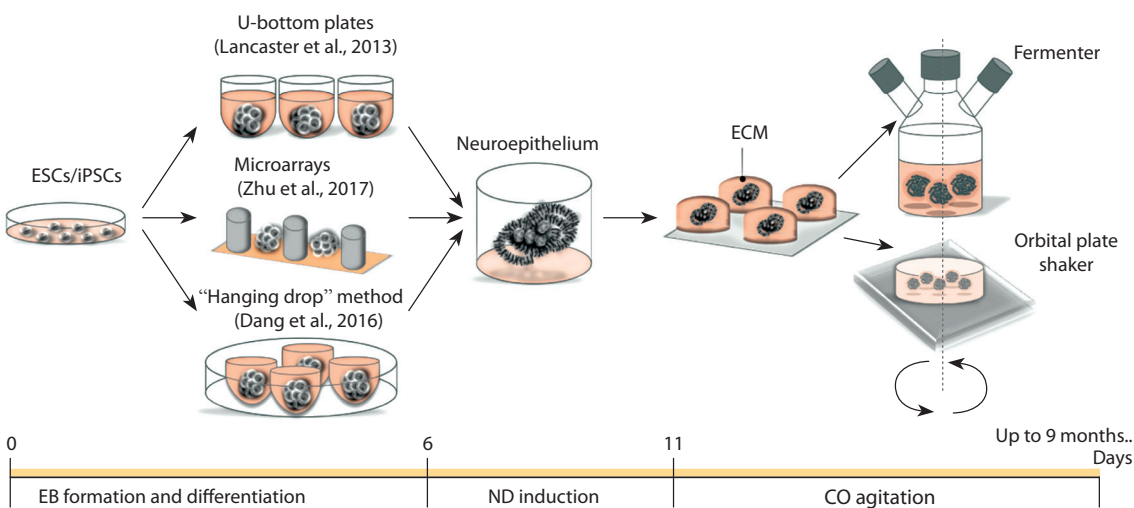


Fig. 2. Raise of cerebral organoids. The first stage (up to 6 days) is the formation and differentiation of EB into cells of three germ layers. The second stage is the induction of neural differentiation. During this period, expansion of neuroectodermal cells occurs. It is additionally stimulated after the embedding into the extracellular matrix (EM). The final stage is the agitation in the medium for differentiation. Designations: ESC, embryonic stem cells; iPSCs, induced pluripotent stem cells; EB, embryoid bodies; ECM, extracellular matrix; ND, neural differentiation; COs, cerebral organoid.

методов культивирования нейральных клеток сыграло важную роль в понимании многих процессов их развития и функционирования (Lapham, Markesbery, 1971; Kennedy et al., 1994). Открытие эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) (Evans, Kaufman, 1981; Thomson et al., 1998), и в особенности индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) (Takahashi, Yamanaka, 2006), ознаменовало новый этап в развитии нейробиологии. Исследователям представилась уникальная возможность получать путем дифференцировки любой тип клеток (Ghodsizadeh et al., 2010; Qiu et al., 2011; Mou et al., 2012; Kim et al., 2013; Kang et al., 2016), включая различные типы нейральных клеток (Cai et al., 2010; Sareen et al., 2014; Huang et al., 2017). Изучение ИПСК и их дифференцированных производных от пациентов с соответствующими заболеваниями во многом позволило исследователям продвинуться в понимании их патологических механизмов (Ananiev et al., 2011; Seibler et al., 2011; Chen et al., 2014). Однако, как любая система двухмерных клеточных культур, нейральные клетки, полученные путем дифференцировки ЭСК/ИПСК, не способны воспроизводить трехмерную структуру головного мозга, что, в свою очередь, важно для изучения заболеваний, вызывающих нарушение нормального хода нейрогенеза. Развитие технологии трехмерных ЦО представляет собой уникальную возможность реконструировать первые этапы развития человеческого мозга наиболее приближенно к условиям *in vivo*.

Известно, что нервная система эмбриона развивается из эктодермального зародышевого листка. В условиях *in vitro* из плюрипотентных стволовых клеток человека (ЭСК или ИПСК) можно получить эктодерму с применением технологии эмбрионидных телец (ЭТ), которые имитируют предимплантационную стадию развития эмбриона и процесс гаструляции (Itskovitz-Eldor et al., 2000). Самый распространенный способ их получения – культивирование в суспензии (Kim et al., 2011) – не является оптимальным, поскольку среди ЭТ наблюдается широкая вариабельность в размере и морфологии, что может негативно сказаться на дифференцировке ЦО. Унифицировать данный этап можно при помощи планшетов с U-образным дном и низкой адгезией (Lancaster et al., 2013), специально разработанных микрочипов (Zhu et al., 2017) или метода «висячей капли» (Dang et al., 2016) (рис. 2).

Для дальнейшего развития эктодермальных клеток в нейроэпителиальные ЭТ перемещаются в среду для индукции нейральной дифференцировки, которая дополнительно препятствует развитию мезодермы и энтодермы (Lancaster, Knoblich, 2014). В качестве исходного типа клеток для формирования ЦО могут быть использованы плюрипотентные клетки, предварительно дифференцированные в НСК (Monzel et al., 2017). При отсутствии базальной мембраны в условиях *in vitro* нейроэпителиальные клетки довольно быстро теряют свою специфическую организацию и уникальные свойства. Для того чтобы предотвратить этот процесс, органоиды необходимо заключать в специальный каркас внеклеточного матрикса, имитирующий базальную мембрану и способствующий дальнейшему разрастанию нейроэктодермы. В качестве такого материала применяются гидрогели (Schwartz et al., 2015; Lindborg et al., 2016) или матригель (Lancaster,

Knoblich, 2014). Ключевой этап в получении ЦО – культивирование в условиях агитации (постоянное перемешивание ростовой среды). Этот элемент крайне важен, поскольку обеспечивает более правильную оксигенацию и распределение питательных веществ во всем органоиде по сравнению со стационарным культивированием, при котором со временем появляется много некротической ткани. Для создания таких условий обычно используются орбитальные шейкеры (Lancaster et al., 2013), биореактор (Lancaster, Knoblich, 2014) или специально разработанные вращающиеся платформы (мини-биореакторы) (Qian et al., 2016). Период культивирования ЦО в зависимости от задач исследователей может длиться до 9 мес. (Lancaster, Knoblich, 2012).

Одно из последних заметных улучшений протокола для получения ЦО появилось в 2017 г. Исследователи совместили трехмерные клеточные культуры с простыми биоинженерными конструкциями. В своей работе они использовали кополимерные микрофибриллы из PLGA в качестве плавающего каркаса для получения эмбрионидных телец вытянутой формы. Такие условия имитировали базальную мембрану кортекса. Полученные таким образом органоиды демонстрировали более эффективную нейроэктодермальную дифференцировку с минимальным вкладом клеток с эндо- и мезодермальным происхождением по сравнению с органоидами, полученными стандартным протоколом. Кроме того, применение вспомогательных конструкций приводило к более правильному формированию характерной цитоархитектоники кортикальной ткани, включая формирование поляризованной КП и радиальных юнитов (Lancaster et al., 2017).

ЦО как перспективная модель для фундаментальных и прикладных исследований

При детальном исследовании клеточной организации ЦО в их составе были идентифицированы разнообразные районы мозга, включая передний мозг и гиппокамп (Lancaster, Knoblich, 2014; Qian et al., 2016), хороидное сплетение (Lancaster, Knoblich, 2014), средний мозг (Qian et al., 2016; Lancaster et al., 2017) и КП (Lancaster et al., 2017) (рис. 3).

Кроме того, несколько исследовательских групп разработали отдельные протоколы для получения ЦО, воспроизводящих строго определенные отделы мозга. Например, ЦО среднего мозга содержали пространственно-организованные группы дофаминергических нейронов (Monzel et al., 2017). В этих же органоидах обнаружен процесс миелинизации нейритов и формирование синапсов. Специализированные органоиды получены также для мозжечка (Muguruma et al., 2015), гиппокампа (Sakaguchi et al., 2015) и переднего мозга (Kadoshima et al., 2013; Mariani et al., 2015). Трехмерная организация районов переднего мозга имела четкую структуру, идентичную КП, формирующейся *in vitro*. Показано, что воспроизводится слоистая структура кортекса, включающая V3, CB3, нейроны глубоких и верхних слоев кортекса (Qian et al., 2016). Обнаружено, что в процессе дифференцировки ЦО внутри них могут образовываться пустоты, которые по своим молекулярным характеристикам и клеточному окружению

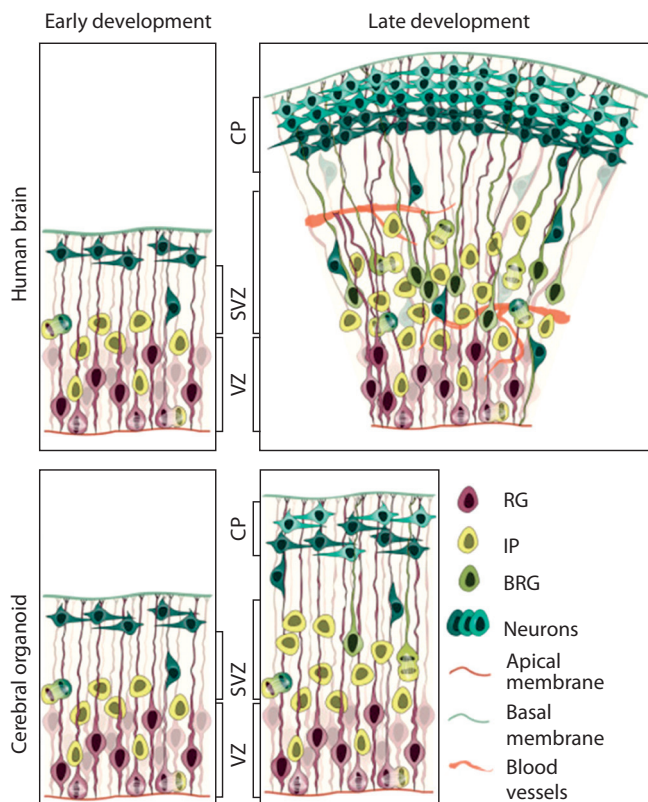


Fig. 3. Comparison of brain development *in vivo* and in cerebral organoids according to Kelava and Lancaster (2016), with modifications. At early stages (left), the cellular compositions and three-dimensional organizations are identical. At later stages (right), differences in cortical plate size and in the diversity and number of neural precursors and neurons are observed. The absence of blood vessels in organoids leads to SVZ reduction and incomplete CP development.

Designations: VZ, ventricular zone; SVZ, subventricular zone; CP, cortical plate.

соответствуют желудочкам головного мозга. Помимо разнообразных типов нейральных клеток на разных стадиях дифференцировки в органоидах образуются глиальные клетки, в том числе астроциты, которые по молекулярным и функциональным характеристикам соответствуют своим аналогам *in vivo* (Dezonne et al., 2017). При длительном культивировании (более 9 мес.) в органоидах появляются дендритные шипики и спонтанно активные нейронные сети (Quadrato et al., 2017).

Еще одним весомым аргументом в пользу целесообразности использования органоидов как модели ранних этапов нейrogenеза человека является соответствие их транскрипционной и эпигенетической программ фетальному мозгу. Исследования транскриптомов ЦО подтвердили, что паттерн и временная динамика экспрессии генов практически полностью воспроизводят аналогичные параметры, обнаруженные в эмбриональном мозге человека (Camp et al., 2015; Luo et al., 2016). Анализ метилома ЦО выявил около 74 % деметилированных районов генома, которые перекрываются с регуляторными элементами фетального мозга. Более того, другой эпигенетической модификацией ДНК – метилированием CpA, CpC или CpT сайтов (He, Ecker, 2015; Schultz et al., 2015), характерной для клеток головного мозга (Lister et al., 2013; Varley et

al., 2013; Guo et al., 2014), оказались обогащены районы генома ЦО, называемые супер-энхансерами. Локусы с большей аккумуляцией подобных меток в этих районах включали несколько генов, участвующих в нейrogenезе (*CUX1*, *AUTS2*, *NFIA1*). Интересно, что данный тип метилирования в ЦО и фетальном мозге не подавляет экспрессию этой группы генов, однако во взрослом состоянии вызывает транскрипционную репрессию подобных районов (Lister et al., 2013; Guo et al., 2014). По всей видимости, такая модификация ДНК представляет собой один из важнейших способов регуляции генной экспрессии при дифференцировке нейральных предшественников в зрелые нейроны (Lister et al., 2013; Varley et al., 2013; Jang et al., 2017), а динамика накопления этих меток, продемонстрированная в ЦО, соответствует динамике *in vivo* (Luo et al., 2016).

Развитие мозга человека включает в себя не только развитие большого количества клеточных типов, объединенных в отдельные отделы и структуры мозга, но и целый комплекс взаимодействий между ними, в том числе миграцию нейронов (Jiménez et al., 2002; Rapalska, Szwabe, 2003). В частности, миграция ГАМКергических интернейронов является одним из важнейших процессов при формировании неокортекса, поскольку они, наряду с глутаматергическими пирамидными нейронами и глией, составляют его клеточную основу (Marín, Müller, 2014). К настоящему времени уже разработаны несколько протоколов для получения ЦО, соответствующих определенным районам мозга (Qian et al., 2016), в связи с чем исследователям предоставляется уникальная возможность изучать некоторые аспекты взаимодействий отдельных регионов мозга. С использованием метода «слитых» ЦО, эквивалентных дорсальной и вентральной частям переднего мозга, исследователи получили дорсо-вентральную ось и смогли промоделировать процесс миграции ГАМКергических вставочных нейронов из ганглиозного бугорка в дорсальную часть церебрального кортекса (Bagley et al., 2017; Xiang et al., 2017). ЦО могут быть применены для изучения взаимодействий не только эндогенных, но и экзогенных клеток, например, при трансплантации микроглии внутрь органоида (Abud et al., 2017).

ЦО в моделировании наследственных заболеваний

Впервые состоятельность метода ЦО как системы для моделирования заболеваний человека продемонстрирована на примере микроцефалии (Lancaster et al., 2013). В ЦО, полученных из ИПСК пациента с микроцефалией, вызванной мутацией в гене *CDK5RAP2*, обнаружены преждевременная дифференцировка ранних нейральных предшественников, нарушения в ориентации веретена деления клеток радиальной глии и уменьшение в целом нейральной ткани. Кроме того, продемонстрировано, что выключение этого гена при помощи РНК-интерференции в нормальных ЦО вызывает гипоплазию, в частности приводит к нарушению ориентации веретена деления в радиальной глии, в то время как сверхэкспрессия, несмотря на свою токсичность, давала возможность частично восстановить фенотип (Lancaster et al., 2013). В качестве еще одного примера хромосомного заболевания выступает

Modeling of human hereditary diseases with COs derived from patient-specific iPSCs

Disease	Gene / Mutation	Organoid phenotype	Reference
Primary microcephaly	<i>CDK5RAP2</i>	Reduced CO size, premature neural differentiation of progenitors, abnormal SD in RG cells (The vertical orientation is indicative of the switch to asymmetrical division)	Lancaster et al., 2013
Miller–Dieker syndrome (microcephaly)	<i>LIS1</i> , <i>YWHAЕ</i>	Reduced CO size, abnormal SD in RG cells (vertical orientation)	Bershteyn et al., 2017; Iefremova et al., 2017
Seckel syndrome (microcephaly)	<i>CENP-J</i>	Reduced CO size, premature neural differentiation of progenitors, abnormal SD in RG cells (vertical orientation)	Gabriel et al., 2016
Rett syndrome	<i>MeCP2</i>	VZ thickness enlarged owing to extensive proliferation of neural progenitors. Differentiation retarded (The progenitors : neurons ratio is elevated)	Mellios et al., 2017
Autism			
(idiopathic)	–	Enhanced proliferation of neural progenitors (shortened cell cycle). Elevated density of neurites and synapses, in particular, inhibitory	Mariani et al., 2015
with macrocephaly	<i>PTEN</i>	Enhanced proliferation of neural progenitors (shortened cell cycle)	Marchese et al., 2014; Li Y. et al., 2017
	<i>CHD8*</i>	Overexpression of genes involved in neurogenesis, neural differentiation, and formation of the forebrain and synaptic transmission*	Wang et al., 2017.
Aicardi–Goutieres syndrome (autoimmune encephalopathy)	<i>TRX1*</i>	Smaller COs, enhanced neuronal apoptosis, elevated astrocyte neurotoxicity (owing to interferon α overproduction)	Thomas et al., 2017

SD, spindle orientation.

*Human iPSCs and ESCs with mutations were generated by the CRISPR/Cas9 genome editing system.

синдром Миллера–Дейкера, наиболее тяжелой формы лиссенцефалии, проявляющейся в виде серьезных пороков развития головного мозга, таких как сглаженная поверхность коры больших полушарий, нарушения в строении кортикальных слоев, микроцефалия и некоторых других. Пациенты с этим синдромом несут гетерозиготную мутацию – микроделецию на 17-й хромосоме (17p13.3). В состав пораженного локуса входят гены *LIS1* и *YWHAЕ*, моносомия по которым приводит к нарушению процесса миграции нервных клеток в коре головного мозга в течение первых трех месяцев развития. Вызвано это тем, что белок Lis1 в комплексе с динеином и NDEL1 регулируют сборку микротрубочек и центросом в клетке и тем самым осуществляют контроль над ориентацией веретена деления в клетке и митоза в целом (Yingling et al., 2008; Moon et al., 2014). Полученные из ИПСК пациентов с этим синдромом ЦО отличались значительно меньшими размерами по сравнению с контрольными, что аналогично микроцефалии у развивающегося эмбриона человека. Описанные выше различия вызваны аберрантным переходом клеток радиальной глии от пролиферативного симметричного типа деления к асимметричному нейрогенному. При индукции соответствующего сигнального пути были исправлены дефекты роста органоидов (Iefremova et al., 2017). Помимо описанных случаев микроцефалии, ЦО успешно применены для моделирования других заболеваний (таблица).

ЦО в моделировании инфекционных заболеваний

Пандемия вируса Зика началась в 2015 г., когда из Центральной Америки стали поступать тревожные сообщения о резко возросшем количестве случаев микроцефалии у новорожденных. В настоящее время связь между тяжелыми пороками развития и лихорадкой Зика широко признана, однако молекулярные и клеточные механизмы этой патологии плохо изучены. Использование животных моделей для исследования патологических процессов, вызванных различными инфекциями, может быть частично полезным, однако такой подход не способен точно воспроизвести все особенности нарушений, появляющихся в эмбриональном головном мозге человека. В связи с этим именно ЦО представляют собой уникальную модель для подобного рода исследований.

При изучении последствий инфекции вируса Зика на ЦО человека несколько независимых исследовательских групп получили схожие результаты. В частности, показано, что инфекция приводит к уменьшению общего размера органоидов, а это, в свою очередь, имитирует микроцефалию, которая возникает у эмбриона (Dang et al., 2016; Garcez et al., 2016; Qian et al., 2016; Gabriel et al., 2017; Li Y. et al., 2017). При более детальном исследовании выяснилось, что вирус Зика имеет собственные клетки-мишени, которыми оказались нейральные клетки-предшественники, преимущественно апикальные, и нейронителы

(Cugola et al., 2016; Garcez et al., 2016; Tang et al., 2016). На клеточном уровне последствия вирусной инфекции проявляются в виде индукции апоптоза и аутофагии и преждевременной дифференцировки вследствие нарушения процесса митоза (Cugola et al., 2016; Garcez et al., 2016; Onorati et al., 2016; Gabriel et al., 2017). В органоидах эти патологические процессы приводят к уменьшению зон пролифераций, в частности VZ, и нарушению строения кортикальных слоев (Cugola et al., 2016; Qian et al., 2016).

Ранее было установлено, что вирус Зика активирует толл-подобные рецепторы 3 (TLR3) в фибробластах кожи человека (Hamel et al., 2015). Аналогичный результат получен для ЦО, зараженных вирусом Зика (Dang et al., 2016). Связь между активацией TLR3 и нарушениями процесса нейrogenеза, включая апоптоз, продемонстрирована в экспериментах с обработкой конкурентными ингибиторами TLR3 инфицированных органоидов. Оказалось, что такое подавление TLR3 уменьшает негативные последствия перенесенной инфекции. Транскриптомный анализ органоидов позволил выявить набор из 41 гена, которые вовлечены в процесс нейrogenеза и меняют свою экспрессию во время активации TLR3. Эти результаты подтверждают факт вовлеченности TLR3 в развитие патологических изменений головного мозга, вызванных вирусом Зика (Dang et al., 2016).

Детальное исследование механизмов проникновения вируса Зика связано не только с получением фундаментальных знаний, но и с их непосредственным применением для разработки лекарственных препаратов, поскольку терапевтическое лечение пациентов в настоящее время отсутствует. По результатам транскриптомного анализа единичных клеточек-мишеней вируса Зика (нейральных стволовых клеток) исследователи выдвинули в качестве потенциального «помощника» для проникновения вирусных частиц в клетки рецептор AXL, который высоко экспрессировался в радиальных клетках органоидов человека (Nowakowski et al., 2016). Однако в другом исследовании (Wells et al., 2016) это предположение поставили под сомнение. В органоидах, полученных из линии ИПСК с нокаутированным геном AXL при помощи системы редактирования генома CRISPR/Cas9, выявить влияние этой мутации на эффективность проникновения вирусных частиц в клетки или индукцию апоптоза не удалось. Полученные результаты ставят под сомнение эффективность ингибиторов AXL как потенциальных лекарственных препаратов для предотвращения врожденных дефектов после заражения вирусом Зика (Wells et al., 2016).

Благодаря использованию ЦО достигнуты определенные успехи в поиске потенциальных лекарственных средств. Например, масштабный высокочувствительный химический скрининг позволил отобрать два соединения: гидробромид гиппеатрина и дигидрат дигидрохлорида амодиахина, которые могут ингибировать вирус Зика в кортикальных предшественниках и при обработке ими органоидов улучшают дефекты роста и дифференцировки, вызванные инфекцией (Zhou et al., 2017). Еще одним из наиболее перспективных соединений является 25-гидроксистерин. Известно, что в ответ на вирусную инфекцию в клетках индуцируется холестерин-25-гидроксилаза, а ее ферментативный продукт 25-гидроксистерин –

основной медиатор защиты хозяина от вируса Зика. Добавление синтетического 25-гидроксистерина *in vitro* блокировало проникновение вирусных частиц в клетки, а лечение инфицированных мышей и макаков-резусов привело к снижению виремии и повышению выживаемости. Аналогичное «лечение» пораженных вирусом Зика ЦО приводило не только к подавлению инфекции, но и к уменьшению повреждений тканей внутри органоидов. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что 25-гидроксистерин обладает эффективным противовирусным действием и потенциально может быть использован в качестве лекарственного препарата для борьбы с инфекцией и предотвращения возникновения таких ее тяжелых последствий, как, например, микроцефалия (Li C. et al., 2017).

Довольно часто поиск потенциальных препаратов для лечения нового заболевания осуществляется среди списка существующих и клинически одобренных, поскольку это помогает преодолеть важные проблемы, в том числе связанные с многолетними клиническими испытаниями. Для лечения вируса Зика было предложено несколько препаратов, которые продемонстрировали противовирусное действие на различных клеточных и животных моделях (Barrows et al., 2016; Delvecchio et al., 2016; Zmurko et al., 2016). Одним из ярких примеров является препарат Софосбувир, клинически одобренный для использования против гепатита С. Его механизм действия заключается в ингибировании РНК-полимеразы – наиболее консервативного белка среди семейства Flaviviridae. Оказалось, что Софосбувир эффективно ингибировал РНК-полимеразу вируса Зика, принадлежащего к тому же семейству, в различных клеточных системах, включая клетки гепатомы, нейробластомы, нервные стволовые клетки, и даже в ЦО человека. Кроме непосредственного ингибирования РНК-полимеразы, Софосбувир индуцировал увеличение частоты мутаций аденозина в гуанозин (A→G) в вирусном геноме. Результаты свидетельствуют о потенциальном использовании ранее клинически одобренного препарата Софосбувир и для лечения вирусной инфекции Зика (Sacramento et al., 2017).

ЦО как модель для изучения эволюционных событий

Размеры головного мозга и его отдельных частей широко варьируются в эволюционном ряду. Вполне вероятно, что именно увеличение относительных размеров коры головного мозга человека способствовало появлению у него уникальных познавательных способностей. Большинство количественных и качественных различий в строении неокортекса разных видов выявлено в сравнительных анатомических исследованиях. Считается, что экспансия коры головного мозга обусловлена различиями в пролиферации и дифференцировке кортикальных предшественников (Rakic, 2009; Geschwind, Rakic, 2013). Тем не менее многие молекулярно-генетические и клеточные механизмы возникновения различий в строении коры больших полушарий у разных видов остаются невыясненными. По всей видимости, единственный способ разгадать эти события заключается в изучении ранних эмбриональных этапов развития человека. Основными ограничениями, стоящими

на пути исследователей, являются морально-этические проблемы, связанные с получением образцов фетального мозга. В связи с этим технология трехмерных ЦО представляет собой уникальную и крайне перспективную модель для установления важнейших механизмов, лежащих в основе эволюционных изменений, возникающих в процессе нейрогенеза (Giandomenico, Lancaster, 2017). Группа исследователей под руководством W.B. Huttner (Mora-Bermúdez et al., 2016), используя метод ЦО, предприняла первую успешную попытку обнаружить некоторые различия в нейрогенезе у человека, шимпанзе и орангутанга. Клеточный состав, цитоархитектоника и транскрипционная программа в нейрогенезе ЦО человека и шимпанзе оказались очень похожи. Среди отличий обнаружено, что в апикальных предшественниках переход от прометафазы к метафазе митоза у человека пролонгирован по сравнению с человекообразными обезьянами. Известно, что у мышей удлинение данной фазы митоза свидетельствует о более высоком пролиферативном потенциале апикальных предшественников (Haubensack et al., 2004). Транскриптомный анализ этих популяций клеток в органоидах человека и шимпанзе позволил выявить небольшой набор генов, которые в них высоко экспрессируются и обеспечивают увеличение их пролиферативного потенциала. Кроме того, доля нейрогенных базальных предшественников в органоидах человека оказалась ниже, что свидетельствует о большей доле активно пролиферирующих клеток (Mora-Bermúdez et al., 2016). По всей видимости, подобные тонкие отличия в различных кортикальных клетках-предшественниках и их пролиферативном потенциале могут иметь решающие последствия для эволюции неокортекса человека.

Недостатки технологии ЦО

ЦО представляют собой уникальную платформу для моделирования ранних этапов нейрогенеза человека. Однако, несмотря на очевидные достоинства, они имеют ряд ограничений и недостатков. Во-первых, ЦО не могут полностью воссоздать структуру эмбрионального мозга *in vivo*, т. е. сформировать отдельные районы мозга в правильном порядке (Lancaster et al., 2013). Прежде всего это связано с отсутствием нормального эмбрионального окружения, включая клеточные элементы и различные паттерны ростовых и сигнальных молекул, которые необходимы для развития в полностью сформированный зрелый орган. Приблизиться к условиям *in vivo* могут помочь биоинженерные методы, в том числе создание трехмерных каркасов, направляющих и стимулирующих развитие конкретных областей мозга (Lancaster et al., 2017). Реконструировать пространственный и временной паттерн сигналов в ЦО в перспективе можно будет при помощи введения миниатюрных носителей, покрытых соответствующими сигнальными молекулами (Kelava, Lancaster, 2016).

Но, пожалуй, самой важной проблемой ЦО остается отсутствие васкуляризации, которая обеспечивает правильную оксигенацию и распределение питательных веществ в головном мозге. Раннее развитие неокортекса происходит без формирования кровеносных сосудов (Vasudevan et al., 2008), однако более поздние стадии развития полностью зависят от этого, поскольку сосудистая система обеспе-

чивает создание ниши в СВЗ для нейральных предшественников (Javaherian, Kriegstein, 2009) и играет важную роль при дифференцировке в нейроны (Lange et al., 2016). Из-за отсутствия васкуляризации размеры органоидов ограничены по причине невозможности проникновения в толщу ЦО питательных веществ и кислорода. Для имитации сосудистой системы перспективными подходами могут оказаться трансплантация мезенхимальных клеток (Takebe et al., 2015) или различные микрофлюидные устройства (Bhatia, Ingber, 2014; Giobbe et al., 2015; Moreno et al., 2015). Решение проблемы васкуляризации в ЦО, вероятно, откроет новые возможности для моделирования не только ранних этапов нейрогенеза, но и поздних, включающих формирование КП и глиогенез.

Acknowledgments

This work was supported by State Budgeted Project 0324-2018-0016. The author is grateful to A.G. Menzorov, I.E. Pristiyazhnyuk, and O.I. Shnaider for valuable remarks.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Abud E.M., Ramirez R.N., Martinez E.S., Healy L.M., Nguyen C.H.H., Newman S.A., Yeromin A.V., Scarfone V.M., Marsh S.E., Fimbres C., Caraway C.A., Fote G.M., Madany A.M., Agrawal A., Kayed R., Gyls K.H., Cahalan M.D., Cummings B.J., Antel J.P., Mortazavi A., Carson M.J., Poon W.W., Blurton-Jones M. iPSC-derived human microglia-like cells to study neurological diseases. *Neuron*. 2017;94(2):278-293.e9. DOI 10.1016/j.neuron.2017.03.042.
- Ananiev G., Williams E.C., Li H., Chang Q. Isogenic pairs of wild type and mutant induced pluripotent stem cell (iPSC) lines from Rett syndrome patients as in vitro disease model. *PLoS One*. 2011; 6(9):e25255. DOI 10.1371/journal.pone.0025255.
- Anthony T.E., Klein C., Fishell G., Heintz N. Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron*. 2004;41(6):881-890.
- Bagley J.A., Reumann D., Bian S., Lévi-Strauss J., Knoblich J.A. Fused cerebral organoids model interactions between brain regions. *Nat. Methods*. 2017;14(7):743-751. DOI 10.1038/nmeth.4304.
- Barrows N.J., Campos R.C., Powell S.T., Prasanth K.R., Schott-Lerner G., Soto-Acosta R., Galarza-Muñoz G., McGrath E.L., Urrabaz-Garza R., Gao J., Wu P., Menon R., Saade G., Fernandez-Salas I., Rossi S.L., Vasilakis N., Routh A., Bradrick S.S., Garcia-Blanco M. A screen of FDA-approved drugs for inhibitors of Zika virus infection. *Cell Host Microbe*. 2016;20(2):259-270. DOI 10.1016/j.chom.2016.07.004.
- Bershteyn M., Nowakowski T.J., Pollen A.A., Di Lullo E., Nene A., Wynshaw-Boris A., Kriegstein A.R. Human iPSC-derived cerebral organoids model cellular features of lissencephaly and reveal prolonged mitosis of outer radial glia. *Cell Stem Cell*. 2017;20(4):435-449.e4. DOI 10.1016/j.stem.2016.12.007.
- Betizeau M., Cortay V., Patti D., Pfister S., Gautier E., Bellemine-Ménard A., Afanassieff M., Huissoud C., Douglas R.J., Kennedy H., Dehay C. Precursor diversity and complexity of lineage relationships in the outer subventricular zone of the primate. *Neuron*. 2013;80(2):442-457. DOI 10.1016/j.neuron.2013.09.032.
- Bhatia S.N., Ingber D.E. Microfluidic organs-on-chips. *Nat. Biotechnol.* 2014;32(8):760-772. DOI 10.1038/nbt.2989.
- Cai J., Yang M., Poremsky E., Kidd S., Schneider J.C., Iacovitti L. Dopaminergic neurons derived from human induced pluripotent stem cells survive and integrate into 6-OHDA-lesioned rats. *Stem Cells Dev*. 2010;19(7):1017-1023. DOI 10.1089/scd.2009.0319.

- Camp J.G., Badsha F., Florio M., Kanton S., Gerber T., Wilsch-Bräuninger M., Lewitus E., Sykes A., Hevers W., Lancaster M., Knoblich J.A., Lachmann R., Pääbo S., Huttner W.B., Treutlein B. Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015; 112(51):15672-15677. DOI 10.1073/pnas.1520760112.
- Chen C., Jiang P., Xue H., Peterson S.E., Tran H.T., McCann A.E., Parast M.M., Li S., Pleasure D.E., Laurent L.C., Loring J.F., Liu Y., Deng W. Role of astroglia in Down's syndrome revealed by patient-derived human-induced pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* 2014; 5:4430. DOI 10.1038/ncomms5430.
- Cugola F.R., Fernandes I.R., Russo F.B., Freitas B.C., Dias J.L., Guimarães K.P., Benazzato C., Almeida N., Pignatari G.C., Romero S., Polonio C.M., Cunha I., Freitas C.L., Brandão W.N., Rossato C., Andrade D.G., Faria D.E., Garcez A.T., Buchpiguel C.A., Braconi C.T., Mendes E., Sall A.A., Zanotto P.M., Peron J.P., Muotri A.R., Beltrão-Braga P.C. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature*. 2016;534(7606):267-271. DOI 10.1038/nature18296.
- Dang J., Tiwari S.K., Lichinchi G., Qin Y., Patil V.S., Eroshkin A.M., Rana T.M. Zika virus depletes neural progenitors in human cerebral organoids through activation of the innate immune receptor TLR3. *Cell Stem Cell*. 2016;19(2):258-265. DOI 10.1016/j.stem.2016.04.014.
- Delvecchio R., Higa L.M., Pezzuto P., Valadão A.L., Garcez P.P., Monteiro F.L., Loiola E.C., Dias A.A., Silva F.J., Aliota M.T., Caine E.A., Osorio J.E., Bellio M., O'Connor D.H., Rehen S., de Aguiar R.S., Savarino A., Campanati L., Tanuri A. Chloroquine, an endocytosis blocking agent, inhibits Zika virus infection in different cell models. *Viruses*. 2016;8(12). DOI 10.3390/v8120322.
- Dezonne R.S., Sartore R.C., Nascimento J.M., Saia-Cereda V.M., Romão L.F., Alves-Leon S.V., de Souza J.M., Martins-de-Souza D., Rehen S.K., Gomes F.C. Derivation of functional human astrocytes from cerebral organoids. *Sci. Rep.* 2017;7:45091. DOI 10.1038/srep45091.
- Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292(5819):154-156.
- Fietz S.A., Kelava I., Vogt J., Wilsch-Bräuninger M., Stenzel D., Fish J.L., Corbeil D., Riehn A., Distler W., Nitsch R., Huttner W.B. OSVZ progenitors of human and ferret neocortex are epithelial-like and expand by integrin signaling. *Nat. Neurosci.* 2010;13(6):690-699. DOI 10.1038/nn.2553.
- Gabriel E., Ramani A., Karow U., Gottardo M., Natarajan K., Gooi L.M., Goranci-Buzhala G., Krut O., Peters F., Nikolic M., Kuivanen S., Korhonen E., Smura T., Vapalahti O., Papantonis A., Schmidt-Chanasit J., Riparbelli M., Callaini G., Krönke M., Utermöhlen O., Gopalakrishnan J. Recent Zika virus isolates induce premature differentiation of neural progenitors in human brain organoids. *Cell Stem Cell*. 2017;20(3):397-406.e5. DOI 10.1016/j.stem.2016.12.005.
- Gabriel E., Wason A., Ramani A., Gooi L.M., Keller P., Pozniakovsky A., Poser I., Noack F., Telugu N.S., Calegari F., Šarić T., Hescheler J., Hyman A.A., Gottardo M., Callaini G., Alkuraya F.S., Gopalakrishnan J. CPAP promotes timely cilium disassembly to maintain neural progenitor pool. *EMBO J.* 2016;35(8):803-819. DOI 10.15252/embj.201593679.
- Garcez P.P., Loiola E.C., Madeiro da Costa R., Higa L.M., Trindade P., Delvecchio R., Nascimento J.M., Brindeiro R., Tanuri A., Rehen S.K. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science*. 2016;352(6287):816-818. DOI 10.1126/science.aaf6116.
- Geschwind D.H., Rakic P. Cortical evolution: judge the brain by its cover. *Neuron*. 2013;80(3):633-647. DOI 10.1016/j.neuron.2013.10.045.
- Ghodsizadeh A., Taei A., Totonchi M., Seifinejad A., Gourabi H., Pournasr B., Aghdami N., Malekzadeh R., Almadani N., Salekdeh G.H., Baharvand H. Generation of liver disease-specific induced pluripotent stem cells along with efficient differentiation to functional hepatocyte-like cells. *Stem Cell Rev.* 2010;6(4):622-632. DOI 10.1007/s12015-010-9189-3.
- Giandomenico S.L., Lancaster M.A. Probing human brain evolution and development in organoids. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2017;44: 36-43. DOI 10.1016/j.ceb.2017.01.001.
- Giobbe G.G., Michielin F., Luni C., Giulitti S., Martewicz S., Dupont S., Floreani A., Elvassore N. Functional differentiation of human pluripotent stem cells on a chip. *Nat. Methods*. 2015;12(7): 637-640. DOI 10.1038/nmeth.3411.
- Götz M., Huttner W.B. The cell biology of neurogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005;6(10):777-788. DOI 10.1038/nrm1739.
- Guo J.U., Su Y., Shin J.H., Shin J., Li H., Xie B., Zhong C., Hu S., Le T., Fan G., Zhu H., Chang Q., Gao Y., Ming G.L., Song H. Distribution, recognition and regulation of non-CpG methylation in the adult mammalian brain. *Nat. Neurosci.* 2014;17(2):215-222. DOI 10.1038/nn.3607.
- Hamel R., Dejarnac O., Wicht S., Ekcharyawat P., Neyret A., Luplertlop N., Perera-Lecoin M., Surasombattapana P., Talignani L., Thomas F., Cao-Lormeau V.M., Choumet V., Briant L., Desprès P., Amara A., Yssel H., Missé D. Biology of Zika virus infection in human skin cells. *J. Virol.* 2015;89(17):8880-8896. DOI 10.1128/JVI.00354-15.
- Harrison R.G. Observations on the living developing nerve fiber. *Exp. Biol. Med.* 1906;7:140-143.
- Haubensak W., Attardo A., Denk W., Huttner W.B. Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004;101(9): 3196-3201. DOI 10.1073/pnas.0308600100.
- He Y., Ecker J.R. Non-CG methylation in the human genome. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2015;16:55-77. DOI 10.1146/annurev-genom-090413-025437.
- Howard B.M., Mo Z., Filipovic R., Moore A.R., Antic S.D., Zecevic N. Radial glia cells in the developing human brain. *Neuroscientist*. 2008;14(5):459-473. DOI 10.1177/1073858407313512.
- Huang L., Chen M., Zhang W., Sun X., Liu B., Ge J. Retinoid acid and taurine promote NeuroD1-induced differentiation of induced pluripotent stem cells into retinal ganglion cells. *Mol. Cell. Biochem.* 2017. DOI 10.1007/s11010-017-3114-x.
- Iefremova V., Manikakis G., Krefft O., Jabali A., Weynans K., Wilkens R., Marsoner F., Brändl B., Müller F.J., Koch P., Ladewig J. An organoid-based model of cortical development identifies non-cell-autonomous defects in Wnt signaling contributing to Miller-Dieker syndrome. *Cell Rep.* 2017;19(1):50-59. DOI 10.1016/j.celrep.2017.03.047.
- Itskovitz-Eldor J., Schuldiner M., Karsenti D., Eden A., Yanuka O., Amit M., Soreq H., Benvenisty N. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol. Med.* 2000;6(2):88-95.
- Jang H.S., Shin W.J., Lee J.E., Do J.T. CpG and non-CpG methylation in epigenetic gene regulation and brain function. *Genes (Basel)*. 2017;8(6). DOI 10.3390/genes8060148.
- Javaherian A., Kriegstein A. A stem cell niche for intermediate progenitor cells of the embryonic cortex. *Cereb. Cortex*. 2009; 19(Suppl. 1):i70-i77. DOI 10.1093/cercor/bhp029.
- Jiménez D., López-Mascaraque L.M., Valverde F., De Carlos J.A. Tangential migration in neocortical development. *Dev. Biol.* 2002; 244(1):155-169. DOI 10.1006/dbio.2002.0586.
- Kadoshima T., Sakaguchi H., Nakano T., Soen M., Ando S., Eiraku M., Sasai Y. Self-organization of axial polarity, inside-out layer pattern, and species-specific progenitor dynamics in human ES cell-derived neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013;110(50):20284-20289. DOI 10.1073/pnas.1315710110.
- Kang H., Shih Y.R., Nakasaki M., Kabra H., Varghese S. Small molecule-driven direct conversion of human pluripotent stem cells into functional osteoblasts. *Sci. Adv.* 2016;2(8):e1600691. DOI 10.1126/sciadv.1600691.
- Kelava I., Lancaster M.A. Dishing out mini-brains: Current progress and future prospects in brain organoid research. *Dev. Biol.* 2016; 420(2):199-209. DOI 10.1016/j.ydbio.2016.06.037.
- Kennedy T.E., Serafini T., de la Torre J.R., Tessier-Lavigne M. Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell*. 1994;78(3):425-435.

- Kim C., Wong J., Wen J., Wang S., Wang C., Spiering S., Kan N.G., Forcales S., Puri P.L., Leone T.C., Marine J.E., Calkins H., Kelly D.P., Judge D.P., Chen H.S. Studying arrhythmogenic right ventricular dysplasia with patient-specific iPSCs. *Nature*. 2013;494(7435):105-110. DOI 10.1038/nature11799.
- Kim J.M., Moon S.H., Lee S.G., Cho Y.J., Hong K.S., Lee J.H., Lee H.J., Chung H.M. Assessment of differentiation aspects by the morphological classification of embryoid bodies derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*. 2011;20(11):1925-1935. DOI 10.1089/scd.2010.0476.
- Lancaster M.A., Corsini N.S., Wolfinger S., Gustafson E.H., Phillips A.W., Burkard T.R., Otani T., Livesey F.J., Knoblich J.A. Guided self-organization and cortical plate formation in human brain organoids. *Nat. Biotechnol*. 2017;35(7):659-666. DOI 10.1038/nbt.3906.
- Lancaster M.A., Knoblich J.A. Spindle orientation in mammalian cerebral cortical development. *Curr. Opin. Neurobiol*. 2012;22(5):737-746. DOI 10.1016/j.conb.2012.04.003.
- Lancaster M.A., Knoblich J.A. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nat. Protoc*. 2014;9(10):2329-2340. DOI 10.1038/nprot.2014.158.
- Lancaster M.A., Renner M., Martin C.A., Wenzel D., Bicknell L.S., Hurler M.E., Homfray T., Penninger J.M., Jackson A.P., Knoblich J.A. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*. 2013;501(7467):373-379. DOI 10.1038/nature12517.
- Lange C., Turrero G.M., Decimo I., Bifari F., Eelen G., Quaegebeur A., Boon R., Zhao H., Boeckx B., Chang J., Wu C., Le Noble F., Lambrechts D., Dewerchin M., Kuo C.J., Huttner W.B., Carmeliet P. Relief of hypoxia by angiogenesis promotes neural stem cell differentiation by targeting glycolysis. *EMBO J*. 2016;35(9):924-941. DOI 10.15252/embj.201592372.
- Lapham L.W., Markesbery W.R. Human fetal cerebellar cortex: organization and maturation of cells in vitro. *Science*. 1971;117(3999):829-832.
- Li C., Deng Y.Q., Wang S., Ma F., Aliyari R., Huang X.Y., Zhang N.N., Watanabe M., Dong H.L., Liu P., Li X.F., Ye Q., Tian M., Hong S., Fan J., Zhao H., Li L., Vishlaghi N., Buth J.E., Au C., Liu Y., Lu N., Du P., Qin F.X., Zhang B., Gong D., Dai X., Sun R., Novitskiy B.G., Xu Z., Qin C.F., Cheng G. 25-Hydroxycholesterol protects host against Zika virus infection and its associated microcephaly in a mouse model. *Immunity*. 2017;46(3):446-456. DOI 10.1016/j.immuni.2017.02.012.
- Li Y., Muffat J., Omer A., Bosch I., Lancaster M.A., Sur M., Gehrke L., Knoblich J.A., Jaenisch R. Induction of expansion and folding in human cerebral organoids. *Cell Stem Cell*. 2017;20(3):385-396.e3. DOI 10.1016/j.stem.2016.11.017.
- Lindborg B.A., Brekke J.H., Vegoe A.L., Ulrich C.B., Haider K.T., Subramaniam S., Venhuizen S.L., Eide C.R., Orchard P.J., Chen W., Wang Q., Pelaez F., Scott C.M., Kokkoli E., Keirstead S.A., Dutton J.R., Tolar J., O'Brien T.D. Rapid induction of cerebral organoids from human induced pluripotent stem cells using a chemically defined hydrogel and defined cell culture medium. *Stem Cells Transl. Med*. 2016;5(7):970-979. DOI 10.5966/sctm.2015-0305.
- Lister R., Mukamel E.A., Nery J.R., Ulrich M., Puddifoot C.A., Johnson N.D., Lucero J., Huang Y., Dwork A.J., Schultz M.D., Yu M., Tonti-Filippini J., Heyn H., Hu S., Wu J.C., Rao A., Esteller M., He C., Haghghi F.G., Sejnowski T.J., Behrens M.M., Ecker J.R. Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development. *Science*. 2013;341(6146):1237905. DOI 10.1126/science.1237905.
- Luo C., Lancaster M.A., Castanon R., Nery J.R., Knoblich J.A., Ecker J.R. Cerebral organoids recapitulate epigenomic signatures of the human fetal brain. *Cell Rep*. 2016;17(12):3369-3384. DOI 10.1016/j.celrep.2016.12.001.
- Malik S., Vinukonda G., Vose L.R., Diamond D., Bhimavarapu B.B., Hu F., Zia M.T., Hevner R., Zecevic N., Ballabh P. Neurogenesis continues in the third trimester of pregnancy and is suppressed by premature birth. *J. Neurosci*. 2013;33(2):411-423. DOI 10.1523/JNEUROSCI.4445-12.2013.
- Marchese M., Conti V., Valvo G., Moro F., Muratori F., Tancredi R., Santorelli F.M., Guerrini R., Sicca F. Autism-epilepsy phenotype with macrocephaly suggests PTEN, but not GLIALCAM, genetic screening. *BMC Med. Genet*. 2014;15:26. DOI 10.1186/1471-2350-15-26.
- Mariani J., Coppola G., Zhang P., Abyzov A., Provini L., Tomasini L., Amenduni M., Szekely A., Palejev D., Wilson M., Gerstein M., Grigorenko E.L., Chawarska K., Pelphrey K.A., Howe J.R., Vaccarino F.M. FOXG1-dependent dysregulation of GABA/Glutamate neuron differentiation in autism spectrum disorders. *Cell*. 2015;162(2):375-390. DOI 10.1016/j.cell.2015.06.034.
- Marin O., Müller U. Lineage origins of GABAergic versus glutamatergic neurons in the neocortex. *Curr. Opin. Neurobiol*. 2014;26:132-141. DOI 10.1016/j.conb.2014.01.015.
- Mellios N., Feldman D.A., Sheridan S.D., Ip J.P.K., Kwok S., Amoah S.K., Rosen B., Rodriguez B.A., Crawford B., Swaminathan R., Chou S., Li Y., Ziats M., Ernst C., Jaenisch R., Haggarty S.J., Sur M. MeCP2-regulated miRNAs control early human neurogenesis through differential effects on ERK and AKT signaling. 2017; *Mol. Psychiatry*. DOI 10.1038/mp.2017.86.
- Miyata T., Kawaguchi A., Saito K., Kawano M., Muto T., Ogawa M. Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Development*. 2004;131(13):3133-3145. DOI 10.1242/dev.01173.
- Monzel A.S., Smits L.M., Hemmer K., Hachi S., Moreno E.L., van Wuelen T., Jarazo J., Walter J., Brüggemann I., Boussaad I., Berger E., Fleming R.M.T., Bolognin S., Schwamborn J.C. Derivation of human midbrain-specific organoids from neuroepithelial stem cells. *Stem Cell Reports*. 2017;8(5):1144-1154. DOI 10.1016/j.stemcr.2017.03.010.
- Moon H.M., Youn Y.H., Pemble H., Yingling J., Wittmann T., Wynshaw-Boris A. LIS1 controls mitosis and mitotic spindle organization via the LIS1-NDEL1-dynein complex. *Hum. Mol. Genet*. 2014;23(2):449-466. DOI 10.1093/hmg/ddt436.
- Mora-Bermúdez F., Badsha F., Kanton S., Camp J.G., Vernot B., Köhler K., Voigt B., Okita K., Maricic T., He Z., Lachmann R., Pääbo S., Treutlein B., Huttner W.B. Differences and similarities between human and chimpanzee neural progenitors during cerebral cortex development. *Elife*. 2016;5:e18683. DOI 10.7554/eLife.18683.
- Moreno E.L., Hachi S., Hemmer K., Trietsch S.J., Baumuratov A.S., Hankemeier T., Vulto P., Schwamborn J.C., Fleming R.M. Differentiation of neuroepithelial stem cells into functional dopaminergic neurons in 3D microfluidic cell culture. *Lab. Chip*. 2015;15(11):2419-2428. DOI 10.1039/c5lc00180c.
- Mou H., Zhao R., Sherwood R., Ahfeldt T., Lapey A., Wain J., Sicilian L., Izvolsky K., Musunuru K., Cowan C., Rajagopal J. Generation of multipotent lung and airway progenitors from mouse ESCs and patient-specific cystic fibrosis iPSCs. *Cell Stem Cell*. 2012;10(4):385-397. DOI 10.1016/j.stem.2012.01.018.
- Muguruma K., Nishiyama A., Kawakami H., Hashimoto K., Sasai Y. Self-organization of polarized cerebellar tissue in 3D culture of human pluripotent stem cells. *Cell Rep*. 2015;10(4):537-550. DOI 10.1016/j.celrep.2014.12.051.
- Nowakowski T.J., Pollen A.A., Di Lullo E., Sandoval-Espinosa C., Bershteyn M., Kriegstein A.R. Expression analysis highlights AXL as a candidate Zika virus entry receptor in neural stem cells. *Cell Stem Cell*. 2016;18(5):591-596. DOI 10.1016/j.stem.2016.03.012.
- Onorati M., Li Z., Liu F., Sousa A.M., Nakagawa N., Li M., Dell'Anno M.T., Gulden F.O., Pochareddy S., Tebbenkamp A.T., Han W., Pletikos M., Gao T., Zhu Y., Bichsel C., Varela L., Szigeti-Buck K., Lisgo S., Zhang Y., Testen A., Gao X.B., Mlakar J., Popovic M., Flamand M., Strittmatter S.M., Kaczmarek L.K., Anton E.S., Horvath T.L., Lindenbach B.D., Sestan N. Zika virus disrupts pPhospho-TBK1 localization and Mitosis in human neuroepithelial stem cells and radial glia. *Cell Rep*. 2016;16(10):2576-2592. DOI 10.1016/j.celrep.2016.08.038.
- Paridaen J.T., Huttner W.B. Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Rep*. 2014;15(4):351-364. DOI 10.1002/embr.201438447.

- Qian X., Nguyen H.N., Song M.M., Hadiono C., Ogden S.C., Hammack C., Yao B., Hamersky G.R., Jacob F., Zhong C., Yoon K.J., Jeang W., Lin L., Li Y., Thakor J., Berg D.A., Zhang C., Kang E., Chickering M., Nauen D., Ho C.Y., Wen Z., Christian K.M., Shi P.Y., Maher B.J., Wu H., Jin P., Tang H., Song H., Ming G.L. Brain-region-specific organoids using mini-bioreactors for modeling ZIKV exposure. *Cell*. 2016;165(5):1238-1254. DOI 10.1016/j.cell.2016.04.032.
- Qiu X., Yang J., Liu T., Jiang Y., Le Q., Lu Y. Efficient generation of lens progenitor cells from cataract patient-specific induced pluripotent stem cells. *PLoS One*. 2011;7(3):e32612. DOI 10.1371/journal.pone.0032612.
- Quadrato G., Nguyen T., Macosko E.Z., Sherwood J.L., Min Yang S., Berger D.R., Maria N., Scholvin J., Goldman M., Kinney J.P., Boyden E.S., Lichtman J.W., Williams Z.M., McCarroll S.A., Arlotta P. Cell diversity and network dynamics in photosensitive human brain organoids. *Nature*. 2017;545(7652):48-53. DOI 10.1038/nature22047.
- Rakic P. Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology. *Nat. Rev. Neurosci.* 2009;10(10):724-735. DOI 10.1038/nrn2719.
- Rapalska K., Szwabe M. Tangential migration of neocortical neurons in early human fetuses. *Folia Morphol. (Warsz.)*. 2003;62(3):223-225.
- Sacramento C.Q., de Melo G.R., de Freitas C.S., Rocha N., Hoelz L.V., Miranda M., Fintelman-Rodrigues N., Marttorelli A., Ferreira A.C., Barbosa-Lima G., Abrantes J.L., Vieira Y.R., Bastos M.M., de Mello Volotão E., Nunes E.P., Tschoeke D.A., Leomil L., Loliola E.C., Trindade P., Rehen S.K., Bozza F.A., Bozza P.T., Boechat N., Thompson F.L., de Filippis A.M., Brüning K., Souza T.M. The clinically approved antiviral drug sofosbuvir inhibits Zika virus replication. *Sci. Rep.* 2017;7:40920. DOI 10.1038/srep40920.
- Sakaguchi H., Kadoshima T., Soen M., Narii N., Ishida Y., Ohgushi M., Takahashi J., Eiraku M., Sasai Y. Generation of functional hippocampal neurons from self-organizing human embryonic stem cell-derived dorsomedial telencephalic tissue. *Nat. Commun.* 2015;6: 8896. DOI 10.1038/ncomms9896.
- Sareen D., Gowing G., Sahabian A., Staggenborg K., Paradis R., Avalos P., Latter J., Ornelas L., Garcia L., Svendsen C.N. Human induced pluripotent stem cells are a novel source of neural progenitor cells (iNPCs) that migrate and integrate in the rodent spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 2014;522(12):2707-2728. DOI 10.1002/cne.23578.
- Schultz M.D., He Y., Whitaker J.W., Hariharan M., Mukamel E.A., Leung D., Rajagopal N., Nery J.R., Urich M.A., Chen H., Lin S., Lin Y., Jung I., Schmitt A.D., Selvaraj S., Ren B., Sejnowski T.J., Wang W., Ecker J.R. Human body epigenome maps reveal noncanonical DNA methylation variation. *Nature*. 2015;523(7559):212-216. DOI 10.1038/nature14465.
- Schwartz M.P., Hou Z., Propson N.E., Zhang J., Engstrom C.J., Santos Costa V., Jiang P., Nguyen B.K., Bolin J.M., Daly W., Wang Y., Stewart R., Page C.D., Murphy W.L., Thomson J.A. Human pluripotent stem cell-derived neural constructs for predicting neural toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015;112(40):12516-12521. DOI 10.1073/pnas.1516645112.
- Seibler P., Graziotto J., Jeong H., Simunovic F., Klein C., Krainc D. Mitochondrial Parkin recruitment is impaired in neurons derived from mutant PINK1 induced pluripotent stem cells. *J. Neurosci.* 2011;31(16):5970-5976. DOI 10.1523/JNEUROSCI.4441-10.2011.
- Smart I.H., Dehay C., Giroud P., Berland M., Kennedy H. Unique morphological features of the proliferative zones and postmitotic compartments of the neural epithelium giving rise to striate and extrastriate cortex in the monkey. *Cereb. Cortex*. 2002;12(1):37-53.
- Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-676. DOI 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- Takebe T., Enomura M., Yoshizawa E., Kimura M., Koike H., Ueno Y., Matsuzaki T., Yamazaki T., Toyohara T., Osafune K., Nakauchi H., Yoshikawa H.Y., Taniguchi H. Vascularized and complex organ buds from diverse tissues via mesenchymal cell-driven condensation. *Cell Stem Cell*. 2015;16(5):556-565. DOI 10.1016/j.stem.2015.03.004.
- Tang H., Hammack C., Ogden S.C., Wen Z., Qian X., Li Y., Yao B., Shin J., Zhang F., Lee E.M., Christian K.M., Didier R.A., Jin P., Song H., Ming G.L. Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. *Cell Stem Cell*. 2016;18(5):587-590. DOI 10.1016/j.stem.2016.02.016.
- Thomas C.A., Tejwani L., Trujillo C.A., Negraes P.D., Herai R.H., Mesci P., Macia A., Crow Y.J., Muotri A.R. Modeling of TREX1-dependent autoimmune disease using human stem cells highlights L1 accumulation as a source of neuroinflammation. *Cell Stem Cell*. 2017;7(21(3):319-331.e8. DOI 10.1016/j.stem.2017.07.009.
- Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282(5391):1145-1147.
- Varley K.E., Gertz J., Bowling K.M., Parker S.L., Reddy T.E., Pauli-Behn F., Cross M.K., Williams B.A., Stamatoyannopoulos J.A., Crawford G.E., Absher D.M., Wold B.J., Myers R.M. Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues. *Genome Res*. 2013;23(3):555-567. DOI 10.1101/gr.147942.112.
- Vasudevan A., Long J.E., Crandall J.E., Rubenstein J.L., Bhidé P.G. Compartment-specific transcription factors orchestrate angiogenesis gradients in the embryonic brain. *Nat. Neurosci.* 2008;11(4):429-439. DOI 10.1038/nn2074.
- Wang P., Mokhtari R., Pedrosa E., Kirschenbaum M., Bayrak C., Zheng D., Lachman H.M. CRISPR/Cas9-mediated heterozygous knockout of the autism gene CHD8 and characterization of its transcriptional networks in cerebral organoids derived from iPSC cells. *Mol. Autism*. 2017;8:11. DOI 10.1186/s13229-017-0124-1.
- Wells M.F., Salick M.R., Wiskow O., Ho D.J., Worringer K.A., Ihry R.J., Kommineni S., Bilican B., Klim J.R., Hill E.J., Kane L.T., Ye C., Kaykas A., Eggan K. Genetic ablation of AXL does not protect human neural progenitor cells and cerebral organoids from Zika virus infection. *Cel Stem Cell*. 2016;19(6):703-708. DOI 10.1016/j.stem.2016.11.011.
- Xiang Y., Tanaka Y., Patterson B., Kang Y.J., Govindaiah G., Rose-laar N., Cakir B., Kim K.Y., Lombroso A.P., Hwang S.M., Zhong M., Stanley E.G., Elefanty A.G., Naegele J.R., Lee S.H., Weissman S.M., Park I.H. Fusion of regionally specified hPSC-derived organoids models human brain development and interneuron migration. *Cell Stem Cell*. 2017;7(21(3):383-398.e7. DOI 10.1016/j.stem.2017.07.007.
- Yingling J., Youn Y.H., Darling D., Toyo-Oka K., Pramparo T., Hirotsune S., Wynshaw-Boris A. Neuroepithelial stem cell proliferation requires LIS1 for precise spindle orientation and symmetric division. *Cell*. 2008;132(3):474-486. DOI 10.1016/j.cell.2008.01.026.
- Zhou T., Tan L., Cederquist G.Y., Fan Y., Hartley B.J., Mukherjee S., Tomishima M., Brennand K.J., Zhang Q., Schwartz R.E., Evans T., Studer L., Chen S. High-content screening in hPSC-neural progenitors identifies drug candidates that inhibit Zika virus infection in fetal-like organoids and adult brain. *Cell Stem Cell*. 2017;21(2):274-283.e5. DOI 10.1016/j.stem.2017.06.017.
- Zhu Y., Wang L., Yu H., Yin F., Wang Y., Liu H., Jiang L., Qin J. In situ generation of human brain organoids on a micropillar array. *Lab. Chip*. 2017;22;17(17):2941-2950. DOI 10.1039/c7lc00682a.
- Zmurko J., Marques R.E., Schols D., Verbeken E., Kaptein S.J., Neyts J. The viral polymerase inhibitor 7-deaza-2'-C-methyladenosine is a potent inhibitor of in vitro Zika virus replication and delays disease progression in a robust mouse infection model. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016;10(5):e0004695. DOI 10.1371/journal.pntd.0004695.



Поиск микроРНК, потенциально задействованных в поддержании самообновления плюрипотентных клеток лабораторной крысы

В.В. Шерстюк^{1, 2, 3, 4}✉, С.П. Медведев^{1, 2, 3, 4}, М.Т. Ри^{5, 6}, Ю.В. Вяткин^{1, 4, 5, 6}, О.В. Сайк¹, Д.Н. Штокало^{1, 5, 6, 7}, С.М. Закиян^{1, 2, 3, 4}

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия

³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁴ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

⁵ ООО «АкадемДжин», Новосибирск, Россия

⁶ Институт Сен-Лорана, Вобурн, США

⁷ Институт систем информатики им. А.П. Ершова Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Самообновление культивируемых плюрипотентных клеток – сложный процесс, объединяющий множество функциональных и регуляторных уровней. В поддержании самообновления клеток принимают участие сеть транскрипционных факторов, широкий спектр их генов-мишеней, включая ферменты, регулирующие структуру хроматина, сигнальные каскады, а также контур, содержащий систему регуляторных некодирующих РНК. Изучение молекулярно-генетических основ поддержания самообновления и реализации свойства плюрипотентности культивируемых клеток млекопитающих является крайне важной задачей для понимания процессов, происходящих в доимплантационном эмбриогенезе, а также для построения эффективных методик получения линий плюрипотентных стволовых клеток в интересах экспериментальной биологии и медицины. МикроРНК (миРНК) играют важную роль в процессах поддержания плюрипотентного состояния и репрограммирования клеток. Однако участие данного класса некодирующих РНК в представленных процессах и функции отдельных миРНК изучены недостаточно. Целью настоящего исследования был поиск миРНК, потенциально участвующих в процессах поддержания плюрипотентного состояния и репрограммирования клеток крысы *Rattus norvegicus*. С использованием методов биоинформатики и данных, полученных в результате секвенирования нового поколения, нами проанализирована экспрессия миРНК в эмбриональных стволовых клетках, индуцированных плюрипотентных стволовых клетках и эмбриональных фибробластах крысы. Проведенный анализ дифференциальной экспрессии между группами плюрипотентных клеток и фибробластов, а также анализ проверенных экспериментально генов-мишеней дифференциально экспрессирующихся известных миРНК крысы позволили выявить новых потенциальных участников процессов поддержания плюрипотентного состояния и репрограммирования. Кроме того, новые потенциальные участники этих процессов обнаружены среди ранее не аннотированных миРНК крысы. Использование биоинформатических подходов и методов системной биологии – первый необходимый шаг при выборе кандидатов для дальнейшего экспериментального изучения. Полученные результаты существенно дополняют представления о системе регуляции самообновления у такого модельного организма, как лабораторная крыса, и расширяют знания о данной системе у млекопитающих в целом.

Ключевые слова: плюрипотентность; микроРНК; системная биология.

The search for microRNAs potentially involved in the self-renewal maintaining of laboratory rat pluripotent stem cells

V.V. Sherstyuk^{1, 2, 3, 4}✉, S.P. Medvedev^{1, 2, 3, 4}, M.T. Ri^{5, 6}, Y.V. Vyatkin^{1, 4, 5, 6}, O.V. Saik¹, D.N. Shtokalo^{1, 5, 6, 7}, S.M. Zakian^{1, 2, 3, 4}

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² E.N. Meshalkin National Medical Research Center, Ministry of Health of Russian Federation, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

⁴ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

⁵ AcademGene LLC, Novosibirsk, Russia

⁶ St. Laurent Institute, Woburn, USA

⁷ A.P. Ershov Institute of Informatics Systems SB RAS, Novosibirsk, Russia

Self-renewal of cultured pluripotent stem cells is a complex process, which includes multiple functional and regulatory levels. Transcription factors, their target genes, chromatin modifiers, signaling pathways, and regulatory noncoding RNAs are involved in the maintaining of self-renewal. Studies of molecular and genetic bases of maintaining self-renewal and pluripotency in cultured mammalian cells are important to understand processes in preimplantation embryogenesis and to develop efficient techniques to obtain pluripotent stem cell lines for experimental biology and medicine. MicroRNAs (miRNAs) play an important role in pluripotency maintaining and reprogramming. However, involvement of this class of noncoding RNAs and functions of individual molecules are poorly studied. The goal of this study was the search for the miRNAs potentially involved in the pluripotency maintaining and reprogramming of *Rattus norvegicus* cells. We analyzed the expression of miRNAs in rat embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells and embryonic fibroblasts using bioinformatic methods and data obtained with next generation sequencing. The analysis of differential expression between groups of rat pluripotent cells and fibroblasts, and the analysis of experimentally confirmed target genes of differentially expressed known rat miRNAs revealed novel potential players of pluripotency maintaining and

reprogramming processes. In addition, novel members of these processes were revealed among novel rat miRNAs. The use of bioinformatic and systems biology approaches is the first step, which is necessary for choosing candidates for the subsequent experimental studies. The results obtained substantially improve our understanding of the self-renewal regulation system of the laboratory rat, a popular biomedical object, and our knowledge about the system in mammals.

Key words: pluripotency; microRNA; system biology.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Шерстюк В.В., Медведев С.П., Ри М.Т., Вяткин Ю.В., Сайк О.В., Штокало Д.Н., Закиян С.М. Поиск микроРНК, потенциально задействованных в поддержании самообновления плюрипотентных клеток лабораторной крысы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(2):179-186. DOI 10.18699/VJ18.345

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Sherstyuk V.V., Medvedev S.P., Ri M.T., Vyatkin Y.V., Saik O.V., Shtokalo D.N., Zakian S.M. The search for microRNAs potentially involved in the self-renewal maintaining of laboratory rat pluripotent stem cells. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(2):179-186. DOI 10.18699/VJ18.345 (in Russian)

Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) могут быть дифференцированы в производные всех трех зародышевых листков. Известно два типа ПСК: эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), получаемые из внутренней клеточной массы бластоцист, и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), получаемые путем сверхэкспрессии факторов плюрипотентности (Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc) из соматических клеток (Evans, Kaufman, 1981; Martin, 1981; Thomson et al., 1998; Takahashi, Yamanaka, 2006). ПСК и их дифференцированные производные нашли широкое применение для изучения процессов, происходящих в раннем развитии, создания моделей генетических заболеваний и тестирования лекарственных препаратов. Для успешного получения, культивирования и применения ПСК необходимо понимание процессов и механизмов, участвующих в регуляции самообновления и поддержания плюрипотентного состояния, а также его реализации в ходе дифференцировки. В настоящее время известно множество факторов, участвующих в регуляции этих процессов, в том числе транскрипционные факторы, эпигенетические механизмы, сигнальные каскады, некодирующие РНК (Васькова и др., 2013; Vaskova et al., 2013; Hackett, Surani, 2014; Huang et al., 2015). Среди некодирующих РНК особое внимание уделяется микроРНК (миРНК) – коротким молекулам длиной от 18 до 25 нуклеотидов, осуществляющим регуляцию экспрессии генов на посттранскрипционном уровне (Eulalio et al., 2008; Filipowicz et al., 2008). Участие в поддержании плюрипотентного состояния клеток мыши и человека показано для ряда миРНК, среди которых наиболее известны миРНК, закодированные в кластерах miR-290-295 (miR-371-373 у человека), miR-302-367, а также миРНК семейства miR-200 (Calabrese et al., 2007; Huang et al., 2015; Yuan et al., 2017). МиРНК крысы, в отличие от мыши, исследованы менее детально как в рамках процесса поддержания плюрипотентности, так и в целом. Крыса *Rattus norvegicus* – один из классических объектов экспериментальной биологии. Однако ЭСК крысы впервые получены только в 2008 г. (Buehr et al., 2008; Li et al., 2008). ЭСК и ИПСК крысы культивируют в условиях отсутствия бычьей эмбриональной сыворотки с добавлением лейкемия-ингибирующего фактора и ингибиторов Mek1/2 и Gsk3 киназ. Ранее при сравнительном анализе транскриптома

ПСК и эмбриональных фибробластов крысы был выявлен ряд видоспецифичных особенностей поддержания плюрипотентного состояния (Vaskova et al., 2015). Таким образом, поиск новых миРНК, задействованных в данном процессе, необходим как для понимания уровня консервативности тех или иных миРНК, так и для выявления новых участников. В настоящей работе проведен поиск новых участников процесса поддержания плюрипотентного состояния среди миРНК на основании результатов полного секвенирования малых РНК, полученных из ЭСК, ИПСК и эмбриональных фибробластов крысы.

Материалы и методы

Анализ первичных данных секвенирования малых РНК. Использованы данные, полученные ранее в ходе секвенирования малых РНК ЭСК, ИПСК и эмбриональных фибробластов крысы и загруженные в базу данных SRA (SRX395433-395442). На первом этапе произведена фильтрация прочтений по качеству и удалена последовательность адаптера при помощи FASTX Toolkit v0.0.14. Далее прочтения картировали на референсный геном *R. norvegicus* (версия gn5) и на референс рибосомальных РНК *R. norvegicus* из базы данных Silva с использованием программного обеспечения BWA v0.7.10-r806 (Gibbs et al., 2004; Quast et al., 2013). Известно, что миРНК имеют характерную длину от 18 до 25 нуклеотидов. Поэтому прочтения длиной менее 18 и более 27 нуклеотидов были удалены из дальнейшего анализа. Проведена фильтрация прочтений от известных повторенных последовательностей класса РНК. В результате обработки получен набор «информативных прочтений». Подсчет уровня экспрессии известных миРНК производили путем вычисления количества информативных прочтений, пересекающихся с координатами известных миРНК *R. norvegicus* из базы данных miRbase v21 (Griffiths-Jones et al., 2006). Нормированный уровень экспрессии миРНК вычисляли по следующей формуле:

$$x_j^i = \frac{R_j^i \cdot 10^6}{(\text{Количество информативных прочтений})_i},$$

где i – образец, j – миРНК; R_j^i – количество прочтений, картированных на миРНК; x_j^i – нормализованный уровень экспрессии (RPM, reads per million).

Поиск новых миРНК крысы. Поиск новых миРНК крысы проведен с использованием программного обеспечения miRanalyzer и miRDeep2. Для полученного набора новых миРНК произведена фильтрация против известных миРНК крысы и повторенных последовательностей класса РНК. Вторичные структуры пре-миРНК получены с использованием программного обеспечения RNAFold (Hofacker, 2003).

Анализ дифференциальной экспрессии миРНК между группами плюрипотентных клеток и эмбриональных фибробластов крысы выполнен с использованием следующего подхода: произведен расчет уровня статистической значимости различий экспрессии миРНК между группами ПСК (ЭСК и ИПСК) и эмбриональных фибробластов с помощью программного пакета edgeR (Robinson et al., 2010). Далее, для того чтобы повысить достоверность данных, были введены критерии: 1) отношение средних значений экспрессии в группах должно быть не менее 3; 2) минимальное значение экспрессии миРНК в одной из групп должно быть в два раза больше максимального значения в другой группе. МиРНК, соответствующие данным критериям, считали дифференциально экспрессирующимися.

Анализ проверенных экспериментально генов-мишеней дифференциально экспрессирующихся известных миРНК. Проверенные экспериментально гены-мишени миРНК человека, мыши и крысы загружены из базы данных MiRTarBase (Hsu et al., 2011). Выявленные гены-мишени прошли дополнительный отбор по изменению уровня экспрессии относительно миРНК. Так, для миРНК, уровень экспрессии которых повышен в ПСК по сравнению с эмбриональными фибробластами, были отобраны только те гены-мишени, которые имеют сниженный уровень экспрессии в ПСК, и наоборот. Применение этого подхода обусловлено основной функцией миРНК, выраженной в негативной регуляции экспрессии мРНК-мишени. Используемые в нашей работе транскриптомные данные были получены ранее для тех же линий клеток (Vaskova et al., 2015). Анализ участия полученных генов-мишеней и дифференциально экспрессирующихся известных миРНК крысы в процессах поддержания стволового состояния и мезенхимально-эпителиального перехода проведен с использованием программного обеспечения ANDSystem (Ivanisenko et al., 2015).

Результаты

Поиск потенциальных участников процесса поддержания плюрипотентности путем анализа дифференциальной экспрессии. Современные технологии секвенирования позволяют находить огромные массивы данных об экспрессии транскриптов. В нашей работе использованы результаты, полученные при секвенировании малых РНК ЭСК, ИПСК и эмбриональных фибробластов крысы. Эти линии клеток получены и охарактеризованы ранее в лаборатории эпигенетики развития Института цитологии и генетики СО РАН (Vaskova et al., 2015). При обработке данных выявлена экспрессия 674 миРНК в ЭСК, ИПСК и эмбриональных фибробластах крысы. Одним из основных подходов при анализе транскриптомных данных является поиск генов, дифференциально экспрес-

сирующихся между типами клеток. В результате анализа дифференциальной экспрессии миРНК между группами ПСК и эмбриональных фибробластов обнаружено 219 дифференциально-экспрессирующихся миРНК. При этом повышенный уровень экспрессии имеют 77 миРНК в ПСК и 142 – в эмбриональных фибробластах. На рис. 1 представлена выборка из дифференциально-экспрессирующихся миРНК с наибольшим уровнем экспрессии в ПСК крысы. Среди миРНК с повышенным уровнем экспрессии в ПСК выявлены ранее известные молекулы, участвующие в поддержании плюрипотентности клеток мыши, такие как миРНК кластера miR-290-295 (miR-290, miR-291a, miR-291b, miR-292, miR-293, miR-294, miR-295) и семейства miR-200 (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, miR-429). В настоящее время эти семейства наиболее изучены в контексте поддержания плюрипотентного состояния, а также процесса репрограммирования к плюрипотентному состоянию (Calabrese et al., 2007; Leonardo et al., 2012; Huang et al., 2014). Для ряда других миРНК, например кластера miR-182-96-183, ранее показана экспрессия в ПСК мыши, но не известны функции и гены-мишени (Zhao et al., 2014). Экспрессия данного кластера выявлена нами также в ПСК крысы. Кроме того, обнаружено 14 миРНК, локализованных в участке размером около 45 т. п. н. на длинном плече X-хромосомы (Xq37): miR-743a, miR-743b, miR-742, miR-883, miR-471, miR-3551, miR-741, miR-463, miR-880, miR-878, miR-881, miR-871, miR-3580, miR-465. Высокий уровень экспрессии в ПСК, а также его снижение при дифференцировке, что было ранее показано для miR-741-3p и miR-743a-3p, позволяют предположить участие данных миРНК в процессе поддержания плюрипотентного состояния.

Поиск потенциальных участников процесса поддержания плюрипотентности путем анализа генов-мишеней миРНК. Известно, что миРНК осуществляют репрессию генов путем связывания с мРНК-мишенью в комплексе RISC (RNA-induced silencing complex), что приводит к деградации целевой мРНК или ингибированию процесса трансляции (Filipowicz et al., 2008). При этом каждая отдельная миРНК может регулировать множество мРНК (Bartel, 2009). Важный этап при анализе миРНК – поиск генов-мишеней. В настоящее время разработано множество программ для поиска потенциальных генов-мишеней миРНК. Среди наиболее известных – TargetScan v7.0 (Agarwal et al., 2015), miRanda v3.3a (Betel et al., 2008), TargetSpy v1.1 (Sturm et al., 2010). Основным недостатком поиска потенциальных генов-мишеней является высокая доля ложноположительных результатов (Yue et al., 2009). Для того чтобы повысить достоверность результатов, в анализе рассматривались только проверенные экспериментально гены-мишени для списка миРНК. Одна из наиболее полных баз данных проверенных экспериментально генов-мишеней миРНК – MiRTarBase (Hsu et al., 2011).

В нашей работе в результате поиска по базе данных MiRTarBase выявлено 457 генов для миРНК, дифференциально-экспрессирующихся между группами ПСК и эмбриональных фибробластов крысы. Чтобы выявить миРНК, участвующие в процессе поддержания стволового состояния, полученные списки генов и дифференци-

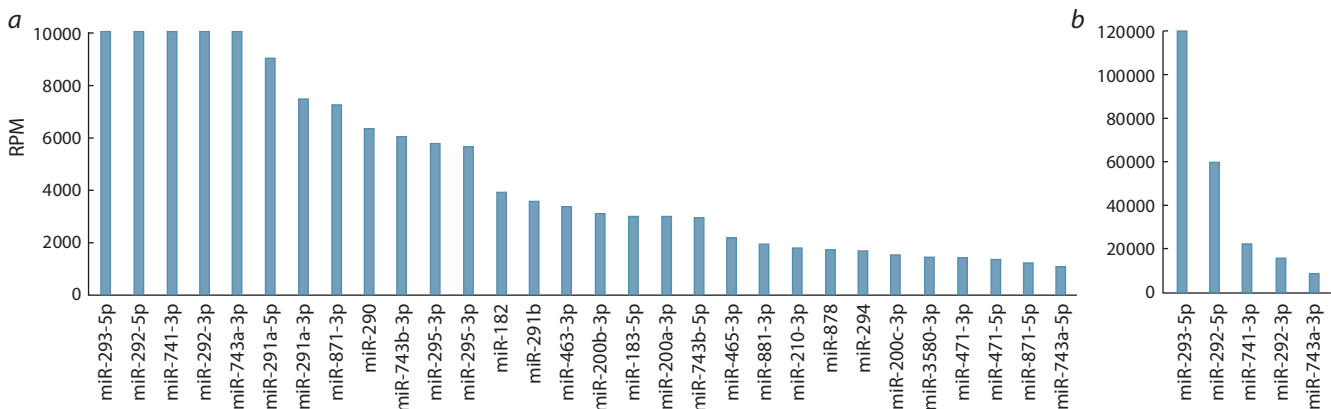


Fig. 1. Upregulated miRNAs in rat pluripotent stem cells compared to embryonic fibroblasts.

(a) Top 30 miRNAs with the highest expression levels in PSCs. (b) Top 5 miRNAs with the highest expression levels in PSCs.

ально-экспрессирующихся миРНК проанализировали с использованием программного обеспечения ANDSystem (Ivanisenko et al., 2015). Эта программа позволяет реконструировать генные сети на основе информации о взаимодействиях между изучаемыми генами, белками, миРНК, метаболитами и др. и их участии в различных процессах, полученной из баз данных опубликованных научных статей и информационных ресурсов. В полученной генной сети представлены известные маркеры плюрипотентного состояния, такие как Nanog, Sox2, Esrrb, Nodal и Lin28a (рис. 2, а) (Huang et al., 2015), в ней присутствуют также миРНК miR-429 и miR-183 с повышенным уровнем экспрессии в ПСК. Можно предположить, что эти миРНК задействованы в процессе поддержания плюрипотентности у крысы. Кроме того, в данной сети участвуют миРНК, вовлеченные в процесс негативной регуляции плюрипотентного состояния клеток мыши и человека, такие как, например, miR-145 и представители семейства let-7 (Xu et al., 2009; Rahkonen et al., 2016). В сети представлены также миРНК семейства miR-181, регулирующие Tcf1 и Wnt3a. Ранее Tcf1 был использован в качестве одного из факторов репрограммирования клеток человека (Picanço-Castro et al., 2011). Wnt3a – участник сигнального пути Wnt, активация которого необходима для поддержания плюрипотентного состояния клеток крысы (Buehr et al., 2008; Li et al., 2008).

Кроме того, дифференциально-экспрессирующиеся миРНК и их экспериментально подтвержденные гены-мишени проанализированы на участие в мезенхимально-эпителиальном переходе (МЭП), ключевом процессе начального этапа репрограммирования соматических клеток к плюрипотентному состоянию (рис. 2, б) (Samavarchi-Tehrani et al., 2010). Одним из основных генов, повышающих уровень экспрессии на начальных этапах репрограммирования, является *Cdh1*, кодирующий E-cadherin и способствующий МЭП (An et al., 2017). *Cdh1* представлен в сети МЭП. В этой сети участвуют три миРНК, две из которых имеют повышенный уровень экспрессии в ПСК (miR-182 и miR-429), одна миРНК (miR-615) имеет повышенный уровень экспрессии в фибробластах. miR-429 относится к семейству miR-200, которое способствует

начальным этапам репрограммирования фибробластов мыши к плюрипотентному состоянию (Samavarchi-Tehrani et al., 2010). miR-182, как известно, повышает уровень экспрессии при репрограммировании фибробластов мыши (Chen et al., 2012). Участие miR-182 в сети МЭП свидетельствует о том, что эта миРНК может способствовать репрограммированию путем активации данного процесса. С другой стороны, miR-615, экспрессия которой снижается при переходе к состоянию плюрипотентности, может являться потенциальным ингибитором процесса репрограммирования. Таким образом, представленный подход, основанный на методах системной биологии и биоинформатики, позволил выявить потенциальных участников процессов поддержания плюрипотентности и репрограммирования для их дальнейшего экспериментального изучения.

Поиск потенциальных участников процесса поддержания плюрипотентности среди новых, ранее не аннотированных миРНК крысы. Новые участники процесса поддержания плюрипотентности могут быть выявлены среди не только известных, но и ранее не аннотированных миРНК. Последняя версия базы данных миРНК mirBase v 21 (<http://mirbase.org/>) содержит 765 зрелых миРНК крысы, в то время как количество известных зрелых миРНК мыши и человека составляет 1915 и 2588 соответственно (Griffiths-Jones et al., 2006). Для поиска новых миРНК существует ряд доступных программ, например miRanalyzer (Hackenberg et al., 2011) и miRDeep2 (Friedlander et al., 2012). В результате поиска новых миРНК крысы с использованием приведенных программ и анализа дифференциальной экспрессии выявлено 10 новых зрелых миРНК с повышенным уровнем экспрессии в ПСК, 4 из 10 миРНК не имеют известных гомологов. Причем 2 из этих 4 миРНК представляют собой зрелые формы (5'- и 3'-плечи) одной пре-миРНК. Остальные 6 миРНК имеют известные гомологи у мыши и человека.

Среди новых миРНК крысы выявлены гомологи miR-302a и miR-302b мыши (рис. 3, а и б). Известно, что данные миРНК участвуют в регуляции плюрипотентного состояния мыши и человека, однако не были обнаружены ранее у крысы (Jouneau et al., 2012). Кроме того, в локусе

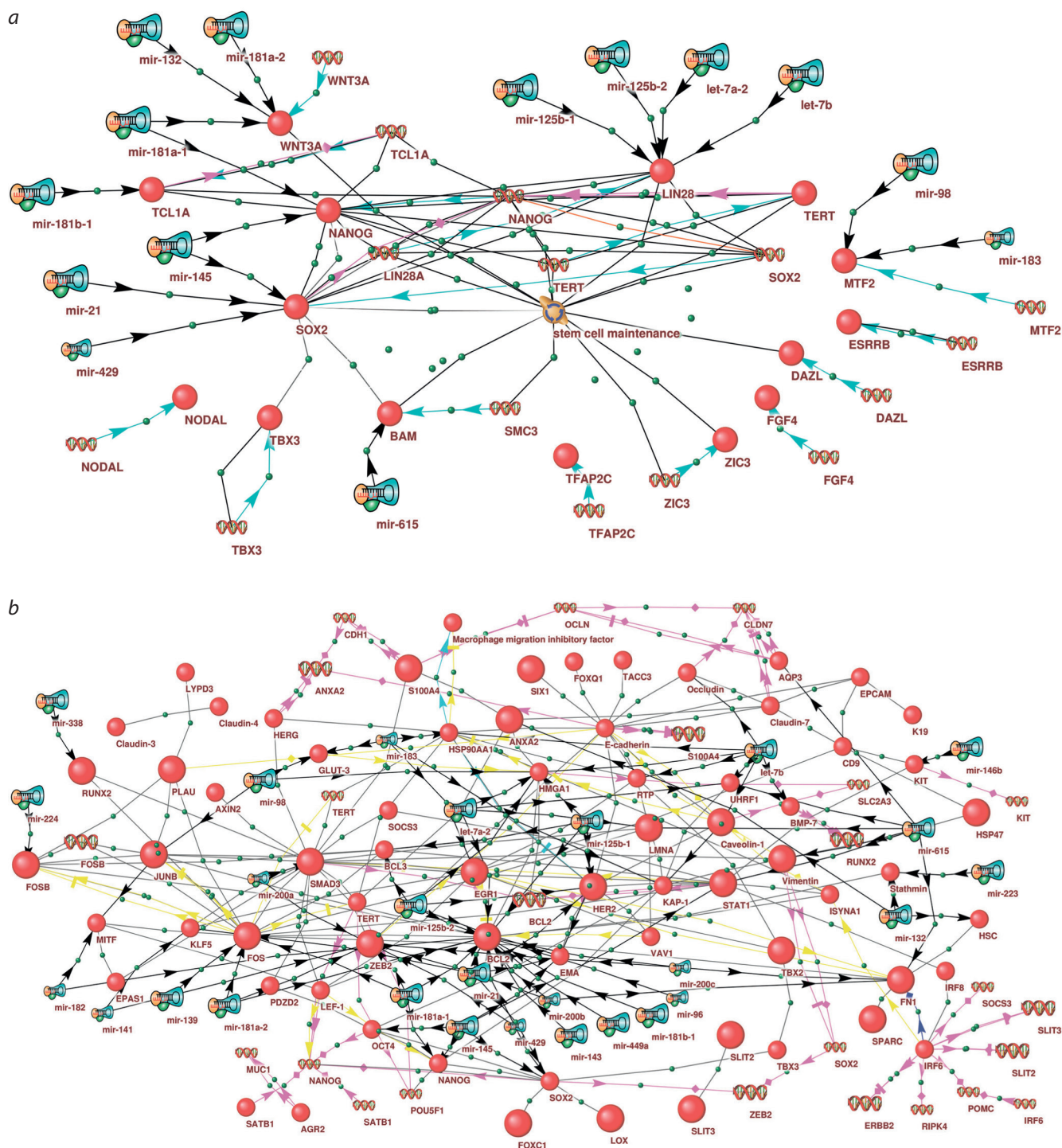


Fig. 2. Gene network that includes differentially expressed miRNAs and their experimentally confirmed target genes involved:
a – stem cell maintenance; b – mesenchyme-to-epithelium transition.

miR-290-295 выявлена новая микроРНК, гомологичная miR-372 человека (см. рис. 3, в). Кластер miR-290-295 мыши и гомологичный ему miR-371-373 человека играют значительную роль в поддержании плюрипотентного состояния (Cao et al., 2015; Yuan et al., 2017). MiR-147, гомолог которой найден нами у крысы, участвует в активации МЭП, опосредованно активируя экспрессию *CDH1* в клетках рака толстой кишки и легких человека (Lee et al., 2014).

Предположительно, данная микроРНК может действовать по аналогичному механизму в ходе репрограммирования. Найдена микроРНК, гомологичная miR-18b мыши. Известно, что miR-18b мыши и человека локализуется в кластере miR-106a-363, экспрессия которого активируется в ходе репрограммирования (Chen et al., 2012).

Среди новых микроРНК крысы, не имеющих известных гомологов у других видов, обнаружена микроРНК, локали-

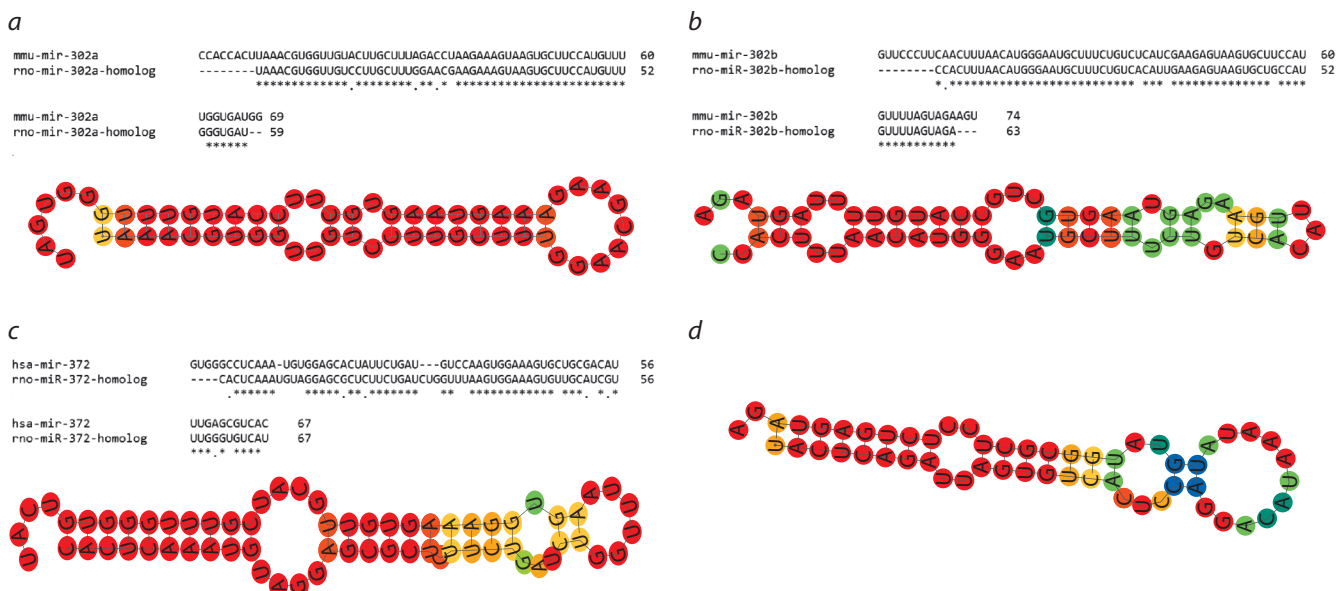


Fig. 3. Nucleotide alignments and secondary structures of novel rat miRNAs with known mouse and human homologs: (a) miR-302a, (b) miR-302b, (c) miR-372. (d) Secondary structure of a novel rat miRNA, which is expressed at a high level in pluripotent stem cells.

зованная на X-хромосоме, с высоким уровнем экспрессии в ПСК крысы (см. рис. 3, *г*). Повышенный уровень экспрессии этой миРНК наблюдается как у 5'-, так и 3'-плеча. Однако уровень экспрессии 3'-плеча гораздо выше чем у 5'-плеча, это показывает, что гены-мишени следует искать для 3'-плеча данной миРНК. Таким образом, на основе результатов тотального секвенирования малых РНК нами выделены кандидаты для дальнейшего анализа среди новых, ранее не аннотированных миРНК крысы.

Обсуждение

Система регуляции плюрипотентного состояния представляет собой сложную сеть взаимодействий множества факторов, среди которых значимую роль играют некодирующие РНК, и в частности миРНК. В настоящее время аннотировано около двух тысяч зрелых миРНК в геноме мыши и почти тысяча – в геноме крысы. Использование подходов системной биологии и биоинформатики необходимо для установления потенциальных участников процесса поддержания плюрипотентности. В представленном нами подходе можно выделить несколько основных этапов: 1) анализ уровня экспрессии известных миРНК; 2) поиск новых, ранее не аннотированных миРНК; 3) установление дифференциально-экспрессирующихся миРНК между группами плюрипотентных и соматических клеток; 4) поиск потенциальных и проверенных экспериментально генов-мишеней дифференциально-экспрессирующихся миРНК; 5) анализ потенциальных и проверенных экспериментально генов-мишеней с использованием ANDSystem (Ivanisenko et al., 2015).

Анализ генов-мишеней является одним из ключевых моментов при изучении функций конкретных молекул миРНК. Однако при анализе проверенных экспериментально генов-мишеней следует отметить следующие проблемы. Так, для различных пар миРНК–мРНК отличается методика, применяемая для экспериментального под-

тверждения. Наиболее достоверными считаются метод с использованием люциферазных конструкций и анализ количества белка с помощью вестерн-блоттинга при трансфекции миРНК (Long, Lahiri, 2011). Менее строгие доказательства пары миРНК–мРНК получены при анализе транскриптомных данных, путем сравнения уровней экспрессии либо в различных типах клеток, либо при трансфекции миРНК в клетки и анализе изменений в экспрессии мРНК (Thomas et al., 2010). В таких случаях влияние миРНК может быть опосредованным. Кроме того, гены-мишени миРНК, экспериментально подтвержденные для определенного типа клеток, могут не регулироваться этой миРНК в другом типе клеток.

В результате проведенного нами исследования сформирован список миРНК-кандидатов для дальнейшей экспериментальной проверки, которая позволит подтвердить или опровергнуть участие данных миРНК в процессе поддержания плюрипотентности. Одним из способов подтверждения участия миРНК в поддержании плюрипотентности является нокаут с дальнейшим анализом состояния клеток и экспрессии маркеров плюрипотентности. Современные технологии редактирования генома позволяют провести нокаут миРНК путем внесения мутаций в район, необходимый для процессинга миРНК, что вызывает нарушение созревания миРНК либо удаление кодирующей последовательности из генома (Chang et al., 2016; Liu et al., 2016). Применение системы CRISPR/Cas9 с двумя направляющими РНК приводит к делеции участка генома между сайтами внесения двуцепочечных разрывов (Essletzbichler et al., 2014). Данный подход успешно применяется для нокаута как миРНК, так и длинных некодирующих РНК (Ho et al., 2015; Zhu et al., 2016). Реализация этого подхода станет следующим этапом изучения выбранных нами миРНК-кандидатов в процессе поддержания плюрипотентного состояния клеток крысы.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Science Foundation, project 16-14-10084.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Agarwal V., Bell G.W., Nam J.W., Bartel D.P. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife*. 2015;4. DOI 10.7554/eLife.05005.
- An J., Zheng Y., Dann C.T. Mesenchymal to epithelial transition mediated by CDH1 promotes spontaneous reprogramming of male germline stem cells to pluripotency. *Stem Cell Reports*. 2017;8(2):446-459. DOI 10.1016/j.stemcr.2016.12.006.
- Bartel D.P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136(2):215-233. DOI 10.1016/j.cell.2009.01.002.
- Betel D., Wilson M., Gabow A., Marks D.S., Sander C. The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res*. 2008;36:D149-D153. DOI 10.1093/nar/gkm995.
- Buehr M., Meek S., Blair K., Yang J., Ure J., Silva J., McLay R., Hall J., Ying Q.L., Smith A. Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell*. 2008;135(7):1287-1298. DOI 10.1016/j.cell.2008.12.007.
- Calabrese J.M., Seila A.C., Yeo G.W., Sharp P.A. RNA sequence analysis defines Dicer's role in mouse embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007;104(46):18097-18102. DOI 10.1073/pnas.0709193104.
- Cao Y., Guo W.T., Tian S., He X., Wang X.W., Liu X., Gu K.L., Ma X., Huang D., Hu L., Cai Y., Zhang H., Wang Y., Gao P. miR-290/371-Mbd2-Myc circuit regulates glycolytic metabolism to promote pluripotency. *EMBO J*. 2015;34(5):609-623. DOI 10.15252/embj.201490441.
- Chang H., Yi B., Ma R., Zhang X., Zhao H., Xi Y. CRISPR/cas9, a novel genomic tool to knock down microRNA in vitro and in vivo. *Sci. Rep*. 2016;6:22312. DOI 10.1038/srep22312.
- Chen J., Wang G., Lu C., Guo X., Hong W., Kang J., Wang J. Synergistic cooperation of microRNAs with transcription factors in iPSC cell generation. *PLoS One*. 2012;7(7):e40849. DOI 10.1371/journal.pone.0040849.
- Essletzbichler P., Konopka T., Santoro F., Chen D., Gapp B.V., Kralovics R., Brummelkamp T.R., Nijman S.M., Bruckstummer T. Megabase-scale deletion using CRISPR/Cas9 to generate a fully haploid human cell line. *Genome Res*. 2014;24(12):2059-2065. DOI 10.1101/gr.177220.114.
- Eulalia A., Huntzinger E., Izaurralde E. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell*. 2008;132(1):9-14. DOI 10.1016/j.cell.2007.12.024.
- Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292(5819):154-156.
- Filipowicz W., Bhattacharyya S.N., Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet*. 2008;9(2):102-114. DOI 10.1038/nrg2290.
- Friedlander M.R., Mackowiak S.D., Li N., Chen W., Rajewsky N. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(1):37-52. DOI 10.1093/nar/gkr688.
- Gibbs R.A., Weinstock G.M., Metzker M.L., Muzny D.M., Sodergren E.J., Scherer S., Scott G., Steffen D., Worley K.C., Burch P.E., Okwuonu G., Hines S., Lewis L., DeRamo C., Delgado O., Dugan-Rocha S., Miner G., Morgan M., Hawes A., Gill R., Celera, Holt R.A., Adams M.D., Amanatides P.G., Baden-Tillson H., Barnstead M., Chin S., Evans C.A., Ferriera S., Fosler C., Glodek A., Gu Z., Jennings D., Kraft C.L., Nguyen T., Pfannkoch C.M., Sitter C., Sutton G.G., Venter J.C., Woodage T., Smith D., Lee H.M., Gustafson E., Cahill P., Kana A., Doucette-Stamm L., Weinstock K., Fechtel K., Weiss R.B., Dunn D.M., Green E.D., Blakesley R.W., Bouffard G.G., De Jong P.J., Osoegawa K., Zhu B., Marra M., Schein J., Bosdet I., Fjell C., Jones S., Krzywinski M., Mathewson C., Siddiqui A., Wye N., McPherson J., Zhao S., Fraser C.M., Shetty J., Shatsman S., Geer K., Chen Y., Abramson S., Nierman W.C., Havlak P.H., Chen R., Durbin K.J., Egan A., Ren Y., Song X.Z., Li B., Liu Y., Qin X., Cawley S., Worley K.C., Cooney A.J., D'Souza L.M., Martin K., Wu J.Q., Gonzalez-Garay M.L., Jackson A.R., Kalafus K.J., McLeod M.P., Milosavljevic A., Virk D., Volkov A., Wheeler D.A., Zhang Z., Bailey J.A., Eichler E.E., Tuzun E., Birney E., Mongin E., Ureta-Vidal A., Woodward C., Zdobnov E., Bork P., Suyama M., Torrents D., Alexandersson M., Trask B.J., Young J.M., Huang H., Wang H., Xing H., Daniels S., Gietzen D., Schmidt J., Stevens K., Vitt U., Wingrove J., Camara F., Alba M.M., Abril J.F., Guigo R., Smit A., Dubchak I., Rubin E.M., Couronne O., Poliakov A., Hubner N., Ganten D., Goesele C., Hummel O., Kreitler T., Lee Y.A., Monti J., Schulz H., Zimdahl H., Himmelbauer H., Lehrach H., Jacob H.J., Bromberg S., Gullings-Handley J., Jensen-Seaman M.I., Kwitek A.E., Lazar J., Pasko D., Tonellato P.J., Twigger S., Ponting C.P., Duarte J.M., Rice S., Goodstadt L., Beaton S.A., Emes R.D., Winter E.E., Webber C., Brandt P., Nyakatura G., Adetobi M., Chiaromonte F., Elnitski L., Eswara O., Hardison R.C., Hou M., Kolbe D., Makova K., Miller W., Nekrutenko A., Riemer C., Schwartz S., Taylor J., Yang S., Zhang Y., Lindpaintner K., Andrews T.D., Caccamo M., Clamp M., Clarke L., Curwen V., Durbin R., Eyraes E., Searle S.M., Cooper G.M., Batzoglu S., Brudno M., Sidow A., Stone E.A., Venter J.C., Payseur B.A., Bourque G., Lopez-Otin C., Puente X.S., Chakrabarti K., Chatterji S., Dewey C., Pachter L., Bray N., Yap V.B., Caspi A., Tesler G., Pevzner P.A., Haussler D., Roskin K.M., Baertsch R., Clawson H., Furey T.S., Hinrichs A.S., Karolchik D., Kent W.J., Rosenbloom K.R., Trumbover H., Weirauch M., Cooper D.N., Stenson P.D., Ma B., Brent M., Arumugam M., Shteynberg D., Copley R.R., Taylor M.S., Riethman H., Mudunuri U., Peterson J., Guyer M., Felsenfeld A., Old S., Mockrin S., Collins F., Rat Genome Sequencing Project C. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature*. 2004;428(6982):493-521. DOI 10.1038/nature02426.
- Griffiths-Jones S., Grocock R.J., van Dongen S., Bateman A., Enright A.J. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(Database issue):D140-D144. DOI 10.1093/nar/gkj112.
- Hackenberg M., Rodriguez-Ezpeleta N., Aransay A.M. miRAnalyzer: an update on the detection and analysis of microRNAs in high-throughput sequencing experiments. *Nucleic Acids Res*. 2011;39:W132-W138. DOI 10.1093/nar/gkr247.
- Hackett J.A., Surani M.A. Regulatory principles of pluripotency: from the ground state up. *Cell Stem Cell*. 2014;15(4):416-430. DOI 10.1016/j.stem.2014.09.015.
- Ho T.T., Zhou N., Huang J., Koirala P., Xu M., Fung R., Wu F., Mo Y.Y. Targeting non-coding RNAs with the CRISPR/Cas9 system in human cell lines. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(3):e17. DOI 10.1093/nar/gku1198.
- Hofacker I.L. Vienna RNA secondary structure server. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(13):3429-3431.
- Hsu S.D., Lin F.M., Wu W.Y., Liang C., Huang W.C., Chan W.L., Tsai W.T., Chen G.Z., Lee C.J., Chiu C.M., Chien C.H., Wu M.C., Huang C.Y., Tsou A.P., Huang H.D. miRTarBase: a database curates experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res*. 2011;39:D163-D169. DOI 10.1093/nar/gkq1107.
- Huang G., Ye S., Zhou X., Liu D., Ying Q.L. Molecular basis of embryonic stem cell self-renewal: from signaling pathways to pluripotency network. *Cell Mol. Life Sci*. 2015;72(9):1741-1757. DOI 10.1007/s00018-015-1833-2.
- Huang H.N., Chen S.Y., Hwang S.M., Yu C.C., Su M.W., Mai W., Wang H.W., Cheng W.C., Schuyler S.C., Ma N., Lu F.L., Lu J.

- miR-200c and GATA binding protein 4 regulate human embryonic stem cell renewal and differentiation. *Stem Cell Res.* 2014;12(2):338-353. DOI 10.1016/j.scr.2013.11.009.
- Ivanisenko V.A., Saik O.V., Ivanisenko N.V., Tiys E.S., Ivanisenko T.V., Demenkov P.S., Kolchanov N.A. ANDSystem: an Associative Network Discovery System for automated literature mining in the field of biology. *BMC Syst. Biol.* 2015;9(2):S2. DOI 10.1186/1752-0509-9-S2-S2.
- Jouneau A., Ciaudo C., Sismeiro O., Brochard V., Jouneau L., Vandormael-Pournin S., Coppee J.Y., Zhou Q., Heard E., Antoniewski C., Cohen-Tannoudji M. Naive and primed murine pluripotent stem cells have distinct miRNA expression profiles. *RNA.* 2012;18(2):253-264. DOI 10.1261/rna.028878.111.
- Lee C.G., McCarthy S., Gruidl M., Timme C., Yeatman T.J. MicroRNA-147 induces a mesenchymal-to-epithelial transition (MET) and reverses EGFR inhibitor resistance. *PLoS One.* 2014;9(1):e84597. DOI 10.1371/journal.pone.0084597.
- Leonardo T.R., Schultheisz H.L., Loring J.F., Laurent L.C. The functions of microRNAs in pluripotency and reprogramming. *Nat. Cell Biol.* 2012;14(11):1114-1121. DOI 10.1038/ncb2613.
- Li P., Tong C., Mehrian-Shai R., Jia L., Wu N., Yan Y., Maxson R.E., Schulze E.N., Song H., Hsieh C.L., Pera M.F., Ying Q.L. Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell.* 2008;135(7):1299-1310. DOI 10.1016/j.cell.2008.12.006.
- Liu Z., Hui Y., Shi L., Chen Z., Xu X., Chi L., Fan B., Fang Y., Liu Y., Ma L., Wang Y., Xiao L., Zhang Q., Jin G., Liu L., Zhang X. Efficient CRISPR/Cas9-mediated versatile, predictable, and donor-free gene knockout in human pluripotent stem cells. *Stem Cell Rep.* 2016;7(3):496-507. DOI 10.1016/j.stemcr.2016.07.021.
- Long J.M., Lahiri D.K. MicroRNA-101 downregulates Alzheimer's amyloid-beta precursor protein levels in human cell cultures and is differentially expressed. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011;404(4):889-895. DOI 10.1016/j.bbrc.2010.12.053.
- Martin G.R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1981;78(12):7634-7638.
- Picanço-Castro V., Russo-Carbolante E., Reis L.C., Fraga A.M., de Magalhães D.A., Orellana M.D., Panepucci R.A., Pereira L.V., Covas D.T. Pluripotent reprogramming of fibroblasts by lentiviral mediated insertion of SOX2, C-MYC, and TCL-1A. *Stem Cells Dev.* 2011;20(1):169-180. DOI 10.1089/scd.2009.0424.
- Quast C., Priesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Pepplies J., Glockner F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 2013;41:D590-D596. DOI 10.1093/nar/gks1219.
- Rahkonen N., Stubb A., Malonzo M., Edelman S., Emani M.R., Närvä E., Lähdesmäki H., Ruohola-Baker H., Lahesmaa R., Lund R. Mature Let-7 miRNAs fine tune expression of LIN28B in pluripotent human embryonic stem cells. *Stem Cell Res.* 2016;17(3):498-503. DOI 10.1016/j.scr.2016.09.025.
- Robinson M.D., McCarthy D.J., Smyth G.K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* 2010;26(1):139-140. DOI 10.1093/bioinformatics/btp616.
- Samavarchi-Tehrani P., Golipour A., David L., Sung H.K., Beyer T.A., Datti A., Woltjen K., Nagy A., Wrana J.L. Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell.* 2010;7(1):64-77. DOI 10.1016/j.stem.2010.04.015.
- Sturm M., Hackenberg M., Langenberger D., Frishman D. TargetSpy: a supervised machine learning approach for microRNA target prediction. *BMC Bioinformatics.* 2010;11:292. DOI 10.1186/1471-2105-11-292.
- Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663-676. DOI 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- Thomas M., Lieberman J., Lal A. Desperately seeking microRNA targets. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2010;17(10):1169-1174. DOI 10.1038/nsmb.1921.
- Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998;282(5391):1145-1147.
- Vaskova E.A., Medvedev S.P., Sorokina A.E., Nemudryy A.A., Elisaphenko E.A., Zakharaova I.S., Shevchenko A.I., Kizilova E.A., Zhelezova A.I., Evshin I.S., Sharipov R.N., Minina J.M., Zhdanova N.S., Khagay I.I., Kolpakov F.A., Sukhikh G.T., Pokushalov E.A., Karasikov A.M., Vlasov V.V., Ivanova L.N., Zakian S.M. Transcriptome characteristics and X-chromosome inactivation status in cultured rat pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.* 2015;24(24):2912-2924. DOI 10.1089/scd.2015.0204.
- Vaskova E.A., Stekleneva A.E., Medvedev S.P., Zakian S.M. "Epigenetic memory" phenomenon in induced pluripotent stem cells. *Acta Naturae.* 2013;5(4):15-21.
- Xu N., Papagiannakopoulos T., Pan G., Thomson J.A., Kosik K.S. MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell.* 2009;137(4):647-658. DOI 10.1016/j.cell.2009.02.038.
- Yuan K., Ai W.B., Wan L.Y., Tan X., Wu J.F. The miR-290-295 cluster as multi-faceted players in mouse embryonic stem cells. *Cell Biosci.* 2017;7:38. DOI 10.1186/s13578-017-0166-2.
- Yue D., Liu H., Huang Y. Survey of computational algorithms for microRNA target prediction. *Curr. Genomics.* 2009;10(7):478-492. DOI 10.2174/138920209789208219.
- Zhao B., Yang D., Jiang J., Li J., Fan C., Huang M., Fan Y., Jin Y., Jin Y. Genome-wide mapping of miRNAs expressed in embryonic stem cells and pluripotent stem cells generated by different reprogramming strategies. *BMC Genomics.* 2014;15:488. DOI 10.1186/1471-2164-15-488.
- Zhu S., Li W., Liu J., Chen C.H., Liao Q., Xu P., Xu H., Xiao T., Cao Z., Peng J., Yuan P., Brown M., Liu X.S., Wei W. Genome-scale deletion screening of human long non-coding RNAs using a paired-guide RNA CRISPR-Cas9 library. *Nat. Biotechnol.* 2016;34(12):1279-1286. DOI 10.1038/nbt.3715.



Исследование функциональности получаемых из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток кардиомиоцитов для моделирования сердечных аритмий при синдроме удлиненного интервала QT

М.М. Слотвицкий¹, В.А. Цвеляя¹, Ш.Р. Фролова¹, Е.В. Дементьева^{2, 3, 4}, К.И. Агладзе¹ ✉

¹ Московский физико-технический институт, Московская область, г. Долгопрудный, Россия

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия

⁴ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Существуют факторы риска, изменяющие нормальное проведение возбуждения в сердце на хаотическое (через образование спиральной волны, т.е. реентри, и последующую фибрилляцию). К этим факторам относятся наследственные и приобретенные каналопатии. Многие опасные изменения в работе ионных каналов сердца могут быть идентифицированы с помощью электрокардиограммы пациента. К легко выявляемым изменениям относится синдром удлинения интервала QT (LQTS) на электрокардиограмме. Несмотря на весьма широкую распространенность наследственного LQTS, к которому нужно добавить и вынужденный LQTS, появляющийся под действием широкого класса фармацевтических препаратов, а также простоту выявления синдрома на ЭКГ, до сих пор не известен механизм образования реентри при этом синдроме. Следует отметить высокую вариативность синдрома (встречаемость 1 : 2500), а также факт связи увеличения частоты сердечных сокращений индивида и значительного повышения риска остановки работы сердца. После достаточно экстенсивного проведения электрофизиологических исследований на отдельных сердечных клетках, получаемых от пациентов с синдромом LQT, стало очевидно, что поиск механизма перехода нормального ритма сердца в хаотический и фибрилляцию не может ограничиваться регистрацией ионных токов в единичных клетках. Для решения такой задачи прежде всего необходима модель поведения сердечной ткани как многоклеточного ансамбля, отражающая связь различных факторов (сбой работы мембранных ионных каналов, действие лекарств, изменения процессов, межклеточные взаимодействия) с риском возникновения реентри. С целью создания экспериментальной модели LQTS в нашей работе индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) пациент-специфичной линии от здорового пациента были дифференцированы в монослой, идентифицированы при помощи иммуноцитохимии и patch-clamp исследованы параметры распространения возбуждения в зависимости от стадии дифференцировки. Показано, что стабильное значение скорости проведения и ответ на периодическую стимуляцию в диапазоне физиологических величин достигаются после 30-го дня дифференцировки.

Ключевые слова: аритмогенность; пациент-специфичность; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК); синдром удлинения интервала QT (LQTS).

The study of the functionality of cardiomyocytes obtained from induced pluripotent stem cells for the modeling of cardiac arrhythmias based on long QT syndrome

M.M. Slotvitsky¹, V.A. Tselaya¹, S.R. Frolova¹, E.V. Dement'eva^{2, 3, 4}, K.I. Agladze¹ ✉

¹ Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow region, Dolgoprudny, Russia

² Institute of Cytology and Genetics SB RAS Novosibirsk, Russia

³ E.N. Meshalkin National Medical Research Center, Ministry of Health of Russian Federation, Novosibirsk, Russia

⁴ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

There are risk factors that lead the normal conduction of excitation in the heart into a chaotic one. These factors include hereditary and acquired channelopathies. Many dangerous changes in the work of the heart can be identified using the patient's electrocardiogram. Such relatively easily detectable changes include the long QT interval syndrome (LQTS). Despite a relatively high prevalence of hereditary LQTS, to which it is necessary to add both hereditary and induced LQTS as well as the ease of detection on the ECG, the mechanism of reentry formation in this syndrome is still unknown. What should be noted is a high variability of the hereditary syndrome and the fact of the connection between the increase in the heart rate and the risk of cardiac arrest. After an electrophysiological study on individual cardiac cells from patients with the LQT syndrome, it became apparent that the search for a mechanism for the transition of the normal heart rhythm to chaotic and fibrillation cannot be limited to recording ion currents in single cells. To solve this problem, we need a model of the behavior of cardiac tissue which reflects the relationship of various factors and the risk of reentry. In order to create an experimental model of LQTS in our work, the iPSC of a patient-specific line from a healthy patient was differentiated into a monolayer of cardiac cells and the parameters of the excitation propagation were studied depend-

ing on the stage of differentiation. It was shown that a stable value of the propagation velocity and the response to periodic stimulation in the range of physiological values, are reached after the 30th day of differentiation.

Key words: arrhythmogenicity test; patient specificity; induced pluripotent stem cells (iPSC); the long QT interval syndrome (LQTS).

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Слотвицкий М.М., Цвеляя В.А., Фролова Ш.Р., Деметьева Е.В., Агладзе К.И. Исследование функциональности получаемых из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток кардиомиоцитов для моделирования сердечных аритмий при синдроме удлиненного интервала QT. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(2):187-195. DOI 10.18699/VJ18.346

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Slotvitsky M.M., Tselaya V.A., Frolova S.R., Dement'eva E.V., Agladze K.I. The study of the functionality of cardiomyocytes obtained from induced pluripotent stem cells for the modeling of cardiac arrhythmias based on long QT syndrome. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(2):187-195. DOI 10.18699/VJ18.346 (in Russian)

Внезапная смерть из-за остановки сердца (sudden cardiac death, SCD) – одна из самых распространенных причин смерти среди активного и трудоспособного населения в мире. Основной причиной SCD, как правило, служит систолическая дисфункция сердца, вызванная нарушенной проводимостью возбуждения в миокарде с образованием спиральной волны проведения, называемой реентри (Fast, Kléber, 1997). Из-за появления вращающихся волн реентри увеличивается риск фибрилляции желудочков, приводящей к SCD. Развитие реентри начинается с возникновения тахиаритмий, происходящих на фоне определяемых на электрокардиограмме удлиненного интервала QT, сердечной недостаточности и инфаркта миокарда (El-Sherif et al., 2014). Синдром удлиненного интервала QT (long QT syndrome, LQTS) описан еще в 1957 г. и до сих пор остается одним из факторов, приводящих к SCD (Jervell, Lange-Nielsen, 1957; Schwartz et al., 1975). LQTS развивается в результате неправильной работы мембранных ионных каналов, что может быть связано с генетическими мутациями. В настоящее время известно более 1000 мутаций примерно в 20 генах, ассоциированных с LQTS (Campuzano et al., 2016). Один из наиболее распространенных типов LQTS, заболеваемость которым охватывает около 30 % общего количества пациентов с врожденным LQTS, вызван мутациями в гене *KCNH2*, кодирующем белок Kv11.1 (hERG1), α -субъединицу канала быстрого калиевого тока задержанного выпрямления IKr (Hou et al., 2010). Для изучения LQTS создано большое количество моделей. Особенно перспективными моделями считаются пациент-специфичные кардиомиоциты, полученные с помощью направленной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), открытых в 2006 г. (Takahashi, Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007). Подобные ИПСК модели зачастую основаны на генной модификации канальных белков и не являются пациент-специфичными (Itzhaki et al., 2011). Из-за разнообразия мутаций и однонуклеотидных полиморфизмов в клеточных линиях, используемых в качестве моделей, полученные из моделей данные могут варьировать в широких пределах. Более того, ИПСК, используемые для создания моделей LQTS, могут содержать примеси других клеток или просто могут быть получены различными протоколами (Horbach, Halfman, 2017). Индивидуальность синдрома LQTS, заключающаяся в различиях экспрессии белков ионных каналов, приводит к наличию индивиду-

альности набора ионных токов практически в каждом случае LQTS и не позволяет точно связать определяемые электрофизиологические свойства отдельной клетки с общим механизмом возникновения реентри в сердечной ткани. Так, только для LQTS 2-го типа (LQTS2) существует около 750 замен, вызывающих различия в экспрессии или функциональности белков ионного канала hERG. Это разнообразие каналопатий приводит к созданию новых антиаритмических средств, которые тестируются на различных индивидуальных моделях, специфичных для пациентов, что часто сводится к неправильному обобщению результатов (Matsa et al., 2011).

Создание адекватной экспериментальной модели сердечной ткани с LQTS, объясняющей появление реентри, должно основываться на общих для этого синдрома свойствах проведения электрического возбуждения в ансамбле сердечных клеток – сердечной ткани. Первым шагом на пути ее создания должно быть определение сроков, в течение которых культивируемая в условиях *in vitro* пациент-специфичная сердечная ткань становится функционально развившейся. Кроме того, в работе выявлены электрофизиологические различия между кардиомиоцитами, полученными при направленной кардиальной дифференцировке ИПСК от пациента с врожденным LQTS и пациента, не страдающего этим заболеванием.

Материалы и методы

Поиск мутаций, вызывающих LQTS. Геномную ДНК выделяли из образца крови пациента с LQTS и использовали в качестве матрицы для амплификации экзонов *KCNQ1* и *KCNH2* с помощью полимеразной цепной реакции. ПЦР-продукты, связанные с экзонами *KCNQ1* и *KCNH2*, секвенированы в ЦКП «Геномика» СО РАН. Нуклеотидные последовательности сравнивали с последовательностями экзонов *KCNQ1* и *KCNH2* из базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, NM_000218.2 и NM_000238.3), чтобы идентифицировать мутации, вызывающие LQTS. В результате у пациента в одном из аллелей гена *KCNH2* обнаружена мутация T613M, приводящая к врожденному LQTS 2-го типа.

Культуры клеток и репрограммирование в плюрипотентное состояние. Фибробласты пациента, несущего мутацию T613M в *KCNH2*, выделены из операционного материала (фрагмента кожи), полученного в ходе имплантации кардиовертера-дефибриллятора в Национальном

медицинском исследовательском центре им. академика Е.Н. Мешалкина Минздрава России. Фибробласты культивировали в среде DMEM: F12 1 : 1, содержащей 15 % эмбриональной бычьей сыворотки (Autogene Bioclear), 1 × GlutaMAX™ Supplement, 1 × пенициллин-стрептомицин.

Фибробласты нуклеофицировали эпизомными векторами, экспрессирующими транскрипционные факторы OCT4, SOX2, KLF4, L-MYC и LIN28 (Addgene IDs #41855-41858, # 41813-41814) с помощью Lonza Nucleofector 2b. Репрограммирование к плюрипотентному состоянию проводили согласно протоколу к EPS5 Episomal iPSC Reprogramming Kit (ThermoFisher Scientific, https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/epi5_episomal_ipsc_reprogramming_man.pdf). Клеточные кластеры, сходные по морфологии с колониями плюрипотентных клеток человека, появлялись начиная с 15-го дня после нуклеофекции. Кластеры переносили при помощи капилляра на фидер (митотически инактивированные фибробласты мыши) и культивировали до получения стабильных линий ИПСК в среде, содержащей 85 % Knockout DMEM, 15 % Knockout Serum Replacement, 1 × GlutaMAX™, 1 × пенициллин-стрептомицин, 1 × раствор незаменимых аминокислот, 0.05 мМ β-меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich), 10 нг/мл основного фактора роста фибробластов (bFGF) (Biologend).

Все реагенты получены от ThermoFisher Scientific (в противном случае поставщик указан отдельно).

Характеристика линий ИПСК. Анализ экспрессии щелочной фосфатазы и генов, участвующих в поддержании плюрипотентного состояния в полученных клеточных линиях, проводили, как описано ранее (Medvedev et al., 2010).

Спонтанная дифференцировка клеточных линий осуществлялась в эмбрионидных тельцах (Medvedev et al., 2010). 14-дневные эмбрионидные тельца дезагрегировали 0.25 % трипсином. Клеточную суспензию высевали на 4-луночные планшеты и культивировали в течение семи дней. Иммунофлуоресцентный анализ дифференцированных клеток выполняли по описанному далее протоколу.

Присутствие эпизомных векторов в линиях ИПСК выявляли с помощью ПЦР. Использовали праймеры rEP4-SF2-oriP (5'-ATCGTCAAAGCTGCACACAG-3') и rEP4-SR2-oriP (5'-CCCAGGAGTCCCAGTAGTCA-3') (Epi5™ Episomal iPSC Reprogramming Kit). Условия ПЦР: 95 °C в течение 15 мин, затем 35 циклов (95 °C, 30 с, 58 °C, 30 с, 72 °C, 40 с), 72 °C в течение 5 мин.

Направленная дифференцировка ИПСК в кардиомиоциты проводилась в соответствии с опубликованным ранее протоколом (Lian et al., 2013). ИПСК культивировали в течение нескольких пассажей в бесфидерных условиях (в среде Essential 8™ Medium на Geltrex LDEV-Free hESC-Qualified Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix (ThermoFisher Scientific)). За три-четыре дня до дифференцировки ИПСК пересаживали на 12-луночные планшеты, диаметр каждой лунки составляет 15 мм. Дифференцировка запускалась при плотности клеток 80–90 % добавлением среды RPMI 1640, содержащей добавку B27-insulin (Thermo Fisher Scientific) и 10 мкМ CHIR99021 (Sigma-Aldrich), на 24 ч. Дальнейшие этапы дифференци-

ровки более подробно описаны в обзоре (Lian et al., 2013), в протоколе GiWi.

Для исследований с иммунофлуоресцентным окрашиванием и patch-clamp дифференцированные клетки дезагрегировали TrypLE™ Express (Thermo Fisher Scientific) и пересаживали на поверхности, покрытые 0.1 % фактором адгезии (AF Gibco) в среду, содержащую 80 % RPMI 1640, 20 % эмбриональной бычьей сыворотки и 10 мкМ Y-27632 (StemRD). Для выделения чистой популяции кардиомиоцитов выполнялась метаболическая селекция дифференцированных клеток в течение семи дней (Burridge et al., 2014) в среде RPMI 1640 без глюкозы (ThermoFisher Scientific), содержащей 213 мкг/мл L-аскорбиновой кислоты, 500 мкг/мл рекомбинантного человеческого альбумина, экспрессированного в рисе, и 5 мМ DL-лактата натрия (Sigma-Aldrich).

Иммунофлуоресцентное окрашивание. Клетки фиксировали в течение 10 мин в 4 % растворе параформальдегида, далее на 10 мин помещали в 0.4 % раствор тритона-X100 или 96 % этанола (для TRA-1-60 и TRA-1-81). Иммуноокрашивание антителами к SSEA-4 проводили без стадии пермеабилзации. Клетки инкубировали 30 мин в блокирующем буфере (1 % бычьего сывороточного альбумина в фосфатном буферном растворе, PBS), далее 16 ч при 4 °C с первыми антителами, затем в течение 1 часа – при комнатной температуре со вторыми антителами. Отмывки от несвязавшихся антител проводили в PBS два раза по 15 мин. ДНК клеток была окрашена DAPI (VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI, Vector, USA, Cat. No. H-1200). Для неспецифического окрашивания на f-актин использовали фаллоидин Alexa Fluor 488. Образцы анализировали с помощью инвертированных флуоресцентных микроскопов (Zeiss LSM 710 и Nikon Eclipse Ti-E).

Первичные антитела и рабочие разведения: TRA-1-60 (Abcam, ab16288) 1:200, TRA-1-81 (Abcam, ab16289) 1:200, SSEA-4 (Abcam, ab16287) 1:50, NANOG (ReproCELL, RCAB003P) 1:200, OCT4 (Santa Cruz, sc-5279) 1:200, нейрофиламент 200 (Sigma, N0142) 1:500, CD31 (Cell Marque, 131M) 1:100, гладкомышечный α-актин (Dako, M0851) 1:50, HNF4α (Santa Cruz, sc-8987) 1:200, сердечный тропонин T (Abcam, ab8295) 1:100, саркомерный α-актинин (Abcam, ab9465) 1:100, миозин (Abcam, ab15) 1:100, NKX2.5 (Санта-Крус, sc-14033). Вторичные антитела (ThermoFisher Scientific, рабочее разведение 1:400) – Alexa Fluor 568 anti-mouse IgG (H+L) highly cross adsorbed (A11031), Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG (H+L) highly cross adsorbed (A11029), Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG1 (A21121), Alexa Fluor 568 anti-rabbit IgG (H+L) (A11011), Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG (H+L) (A11008).

Подготовка образцов и растворов для оптического картирования и patch-clamp. Все стекла для оптического картирования и рабочие камеры для patch-clamp были автоклавируются и помещены в 12-луночные планшеты или чашки Петри, предварительно стерилизованные ультрафиолетом. Стекла для высаживания клеток были покрыты Geltrex, согласно описанию в руководстве (Gibco, Geltrex® hESC-qualified Ready-To-Use Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix). ИПСК высевали на стекла в концентрации 40000 клеток/см² и далее диф-

ференцировали в кардиомиоциты. Для исследований на patch-clamp 13-миллиметровые стекла были покрыты специальным фактором адгезии (AF, Gibco). Концентрация дифференцированных клеток для patch-clamp составляла 10000 клеток/см².

Оптическое картирование. Перед процедурой оптического картирования все химические растворы нагревали до 37 °C. Процесс осуществлялся в соответствии с протоколом: образец окрашивали кальций-зависимым флуоресцентным красителем флюо-4 (AM) в течение 30–40 мин при 37 °C в CO₂-инкубаторе, далее его промывали раствором Tyrode (Sigma-Aldrich Co., США, T2145-10L) и помещали на термоплет для поддержания температуры 37 °C. Визуализация волн возбуждения и видеозапись реализованы с помощью установки, состоящей из флуоресцентного микроскопа Olympus MVX-10 Macro-View и высокоскоростной Andor EM-CCD Camera 897-U. Файл конфигурации был загружен с фиксированными параметрами видеонаблюдения (130 кадров в секунду). Обработка данных выполнена с использованием программы ImageJ и плагинов для этой программы (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Экспериментальный сигнал оптического отображения обработан для уменьшения шума и лучшего представления волновых фронтов с использованием программы Wolfram Mathematica 9. Процедура оптического картирования проводилась менее 30 мин во избежание чрезмерного стресса для клеток. После процедуры картирования образец дважды промывали раствором PBS. После этого раствор Tyrode заменяли средой RPMI 1640 с добавкой B27. Образец помещали обратно в инкубатор до следующих исследований.

Электрофизиологические записи (patch-clamp). Ионные токи регистрировали в одиночных изолированных кардиомиоцитах методом перфорированного patch-clamp в конфигурации whole-cell. В качестве перфорирующего агента использовали амфотерицин Б в ДМСО (диметилсульфоксид) в концентрации 0.24 мг/мл (Lippiat, 2009). Эксперименты проводили при комнатной температуре (22–24 °C). Покровные стекла с посаженными на них сердечными клетками помещали в камеру, установленную на предметном столике инвертированного микроскопа Olympus IX71. В камере постоянно обновляли внеклеточный раствор.

Растворы и протоколы для patch-clamp. Камерный раствор, используемый для регистрации потенциала действия (ПД), содержал 150 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 15 mM D-глюкозы, 15 mM HEPES/NaOH, 1 mM Na-пирувата (значение pH раствора доведено до 7.4 с помощью раствора NaOH). Пипеточный (внутриклеточный) раствор состоял из 150 mM KCl, 5 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES/NaOH, 5 mM MgATP (pH = 7.2, аналогично при использовании раствора KOH).

Раствор внеклеточный, используемый для записи Na⁺ тока: 50 mM NaCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 110 mM CsCl₂, 10 mM D-глюкозы, 10 mM HEPES/NaOH (pH = 7.4 с помощью CsOH). Пипеточный (внутриклеточный) раствор для регистрации Na⁺ тока: 135 mM CsCl₂, 10 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES/NaOH, 5 mM MgATP (pH 7.2 с помощью CsOH).

Камерный раствор для регистрации тока Ca²⁺: 160 mM TEA-Cl, 5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM D-глюкозы,

10 mM HEPES/NaOH (pH = 7.4 CsOH). Пипеточный раствор содержал 145 mM CsCl₂, 5 mM NaCl, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES/NaOH, 5 mM MgATP (pH = 7.2 с помощью CsOH).

Для регистрации токов I_{Kr} камерный раствор содержал 150 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 15 mM D-глюкозы, 15 mM HEPES/KOH (pH = 7.4 с помощью NaOH) и пипеточный раствор: 150 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 5 mM NaCl, 5 mM MgATP, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES/KOH (pH 7.2 с помощью KOH) (Ma et al., 2011).

Пипетки для patch-clamp вытягивали из боросиликатного стекла (BF150-86-10 Sutter Instrument, США) сопротивлением ~3 MΩ в экспериментальном растворе. После формирования гигаомного сопротивления (GΩ) емкостные компоненты компенсировали с помощью настроек усилителя. По мере перфорации мембраны, заключенной в кончике пипетки, с помощью антибиотика медленные емкостные компоненты увеличивались. После компенсации сопротивления R_a начинались детектирования токов и потенциала действия с помощью установленных протоколов. При необходимости компенсировалось последовательное сопротивление.

Потенциал действия был вызван применением фиксированного тока амплитудой 1 нА в течение 2.5 мс.

Токи целой клетки для детектирования натриевого тока Na⁺ были вызваны по протоколу, представляющему собой нарастающий стимул от –120 до +50 мВ длительностью 200 мс при поддерживающем потенциале –80 мВ (с использованием ступеньки в начале протокола: от –80 до –120 мВ длительностью 100 мс) (Estacion, Waxman, 2013).

Для записи тока Ca²⁺ L-типа без помехи Na⁺ тока использовали ступенчатый протокол с прерыванием от поддерживаемого потенциала от –80 до –40 мВ длительностью 100 мс. Пик тока I_{Ca, L} измеряли при 0 мВ (Pelzmann et al., 1998). Быстрая (I_{Ks}) и медленная (I_{Kr}) компоненты калиевого тока задержанного выпрямления получены 5-секундным деполяризующим импульсом от –40 до +50 мВ с шагом 10 мВ (при поддерживаемом потенциале –70 мВ). Как правило, емкость мембран, измеренная с помощью программного обеспечения pCLAMP10.2, варьировалась 20–50 пФ.

Результаты

Образование и характеристика монослоев кардиомиоцитов. Использовали две линии: if31-5 (полученная от пациента с LQTS с мутацией T613M в гене *KCNH2*) и в качестве контроля – iSMA6L (от пациента без LQTS) (Григорьева и др., 2016). Поиск мутации у пациента с LQTS, получение и характеристика пациент-специфичных ИПСК приведены в разделе «Материалы и методы». Показано, что линия if31-5 экспрессирует все основные маркеры плюрипотентного состояния (щелочная фосфатаза, поверхностные антигены), а также способна спонтанно дифференцироваться в производные трех зародышевых листков, что подтверждает успешность репрограммирования к плюрипотентному состоянию.

После начала направленной дифференцировки ИПСК в кардиомиоциты клетки с восьмого дня (с момента первых сокращений) ежедневно исследовали на предмет образования функционального синцития и основных

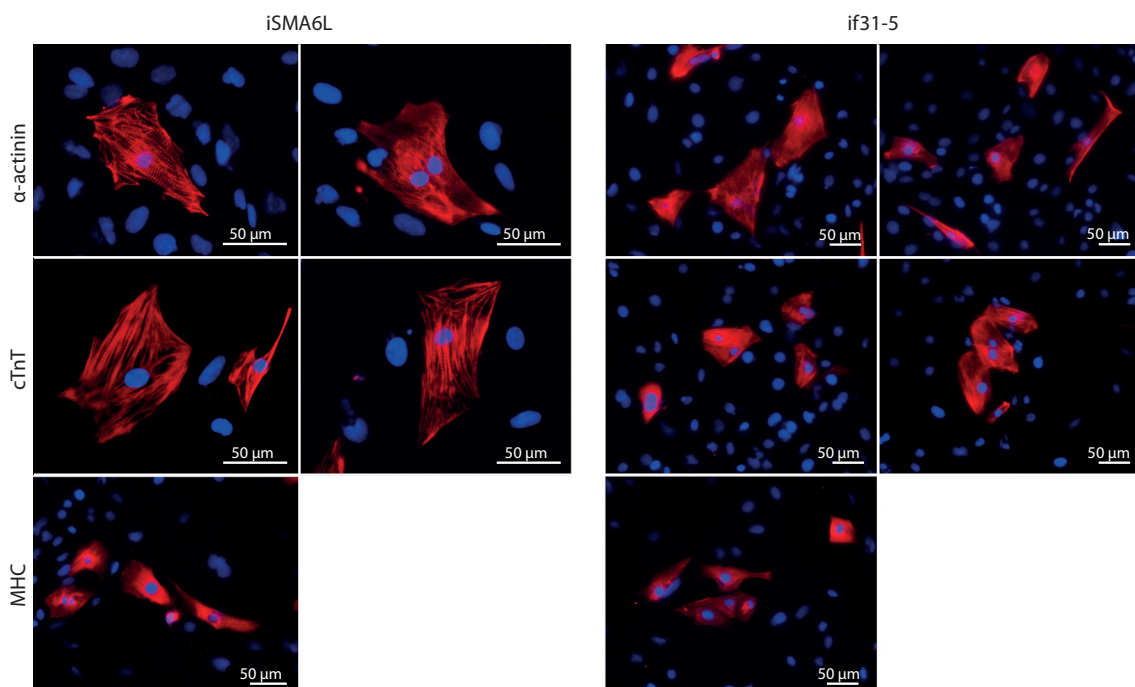


Fig. 1. Immunocytochemistry of differentiated cells. The dyeing of fluorescent antibodies specific for cardiomyocytes is described in Methods.

The figure shows the expression of cTnT, MHC, and alpha-actinin (red marker), confirming that cells fluorescing red are cardiomyocytes. Cells with only nuclei colored (blue marker, DAPI) are other cell types, which do not express cTnT, MHC, or alpha-actinin.

структур, присущих кардиомиоцитам, таких как саркоплазматический ретикулум и миофибриллы. Выявлялась также тенденция на повышение экспрессии определенных ионных каналов и формирование полноценного потенциала действия. Уже на девятый день после начала дифференцировки в клетках наблюдалась экспрессия тяжелой цепи β -миозина и слабо выраженная поперечнополосатая исчерченность α -актинина. С 12-го дня развивались саркомеры. К 30-му дню кардиомиоциты можно было считать зрелыми в соответствии со сформированными структурами. В процессе дифференцировки клеточный слой образовал проводящую структуру сердечных клеток. Начиная с 12-го дня в монослое отмечалось наличие специфичных маркеров connexin-43. Экспрессия основных маркеров кардиомиоцитов, полученных при дифференцировке iSMA6L и if31-5, приведена на рис. 1.

Следует отметить, как происходило образование проводящей структуры из сердечных клеток. Начиная с девятого дня клетки из слоя подвергали самосборке таким образом, что проводящие клетки были организованы в кластеры. Примерно с 15-го дня клетки в кластерах были способны генерировать и проводить возбуждение.

Окончательное формирование структур и их самоорганизация происходили примерно через 30–35 дней после начала дифференцировки. После этого наблюдались рост и созревание кардиомиоцитов, что продемонстрировано оптическим картированием.

Электрофизиологическое сравнение линий iSMA6L и if31-5. Потенциалы действия (ПД) кардиомиоцитов линий iSMA6L и if31-5 регистрировали с 10-го до 50-го дня после начала дифференцировки. Для записи потен-

циала действия к кардиомиоцитам iSMA6L был применен стимул с амплитудой 1 нА длительностью 2.5 мс частотой 1 Гц. Уже на 12-й день дифференцировки линии iSMA6L форма ПД соответствовала форме ПД желудочкового кардиомиоцита, но ПД имел укороченную длительность (200 мс) (рис. 2, a1). В дальнейшем была выявлена тенденция к установлению нормальной длительности потенциала действия, соответствующей желудочковому кардиомиоциту человека. На 21-й день дифференцировки длительность ПД составляла 250 мс (рис. 2, a2), с 28-го дня длительность составляла около 400 мс (рис. 2, a3). С 14-го дня можно было регистрировать быстрый натриевый ток. Для обнаружения потенциал-зависимого натриевого тока INa^+ применялся протокол в форме «рампа» со стимуляцией от -120 до $+50$ мВ длительностью 200 мс (рис. 2, b2).

Потенциалзависимый кальциевый ток L-типа, ICa_{L-type} вызван применением протокола стимула в виде ступеньки от -40 до 0 мВ длительностью 300 мс (рис. 2, b2). Кальциевый ток в линии iSMA6L детектировался с 18-го дня. Для регистрации быстрой ИКг и медленной ИКс компонент калиевого тока задержанного выпрямления применен стимул в виде ступенек с потенциалом от -40 до 50 мВ с шагом в 10 мВ длительностью 5 с при поддерживаемом потенциале -40 мВ (рис. 2, b3).

Аналогично характеризовались кардиомиоциты линии if31-5. Потенциал действия был вызван стимуляцией с амплитудой 1 нА длительностью 2.5 мс частотой 1 Гц. На 15-й день дифференцировки линии if31-5 длительность потенциала действия составляет всего в среднем 200 мс (рис. 3, a1), на 27-й день длительность потенциала дей-

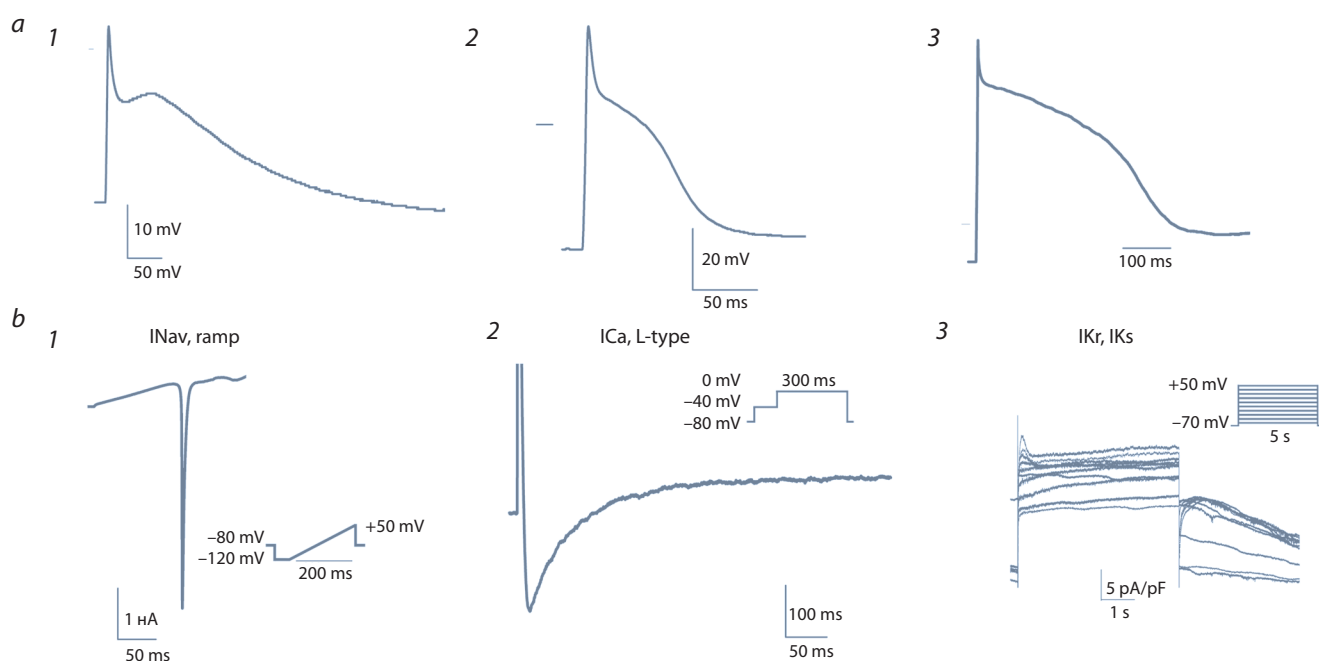


Fig. 2. Electrophysiological analysis of isolated cardiomyocytes differentiated from iSMA6L cells.

(a) Action potentials at different stages of differentiation measured by the patch-clamp method: 1, on day 12 of differentiation; 2, on day 21; 3, on day 28. (b) Potential-dependent ion currents in iSMA6L-derived cardiomyocytes obtained by whole-cell patch-clamp recording: 1, sodium current I_{Na}^+ , obtained by stimulation of iSMA6L-derived cardiomyocytes by the ramp protocol; 2, calcium current obtained in iSMA6L-derived cardiomyocytes; 3, potassium currents of delayed rectification obtained in iSMA6L-derived cardiomyocytes.

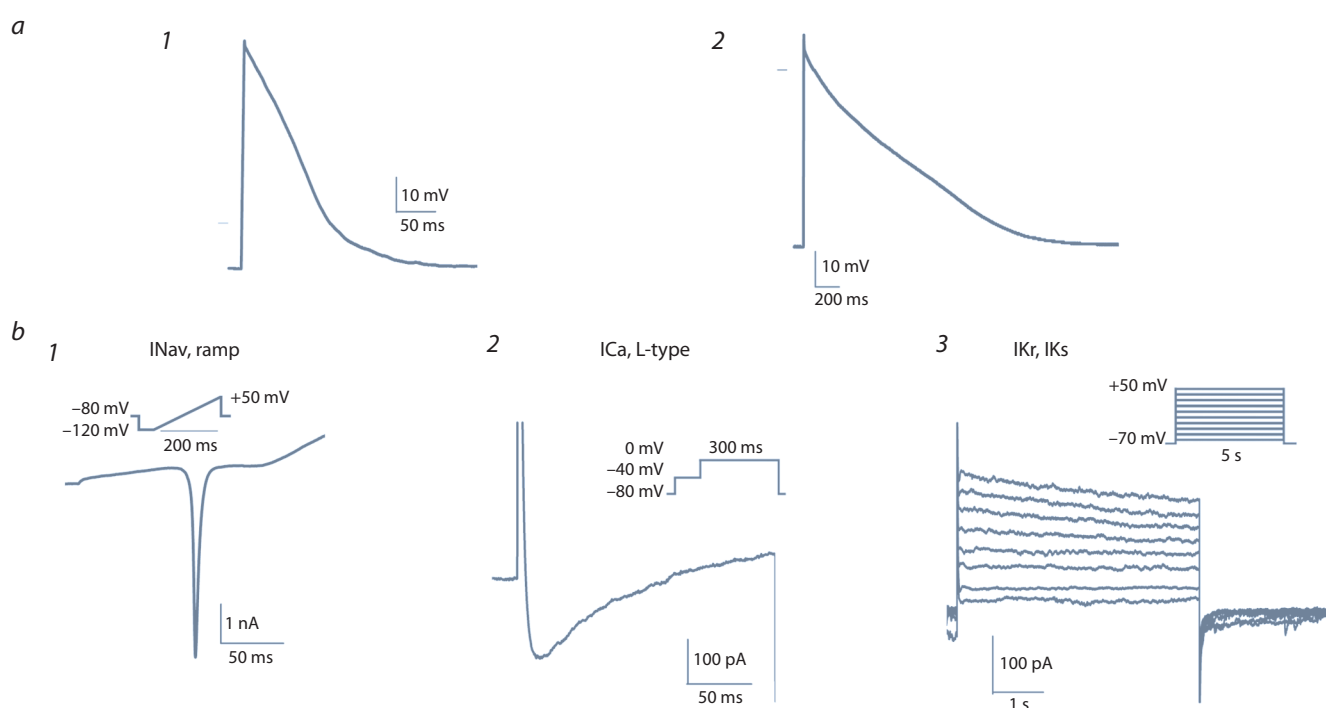


Fig. 3. Electrophysiological analysis of isolated cardiomyocytes differentiated from the if31-5 line.

(a) Action potentials at different stages of differentiation measured by the patch-clamp method: 1, AP of a human if31-5-derived cardiomyocyte obtained on day 15 of differentiation; 2, on day 27 of differentiation.

(b) Potential-dependent ion currents of if31-5-derived cardiomyocytes measured by whole-cell patch-clamp recording: 1, sodium current I_{Na}^+ obtained by stimulation of differentiated cardiomyocytes of the if31-5 line by the ramp protocol; 2, calcium current obtained from iSMA6L-derived cardiomyocytes; 3, potassium currents of delayed rectification obtained from if31-5-derived cardiomyocytes.

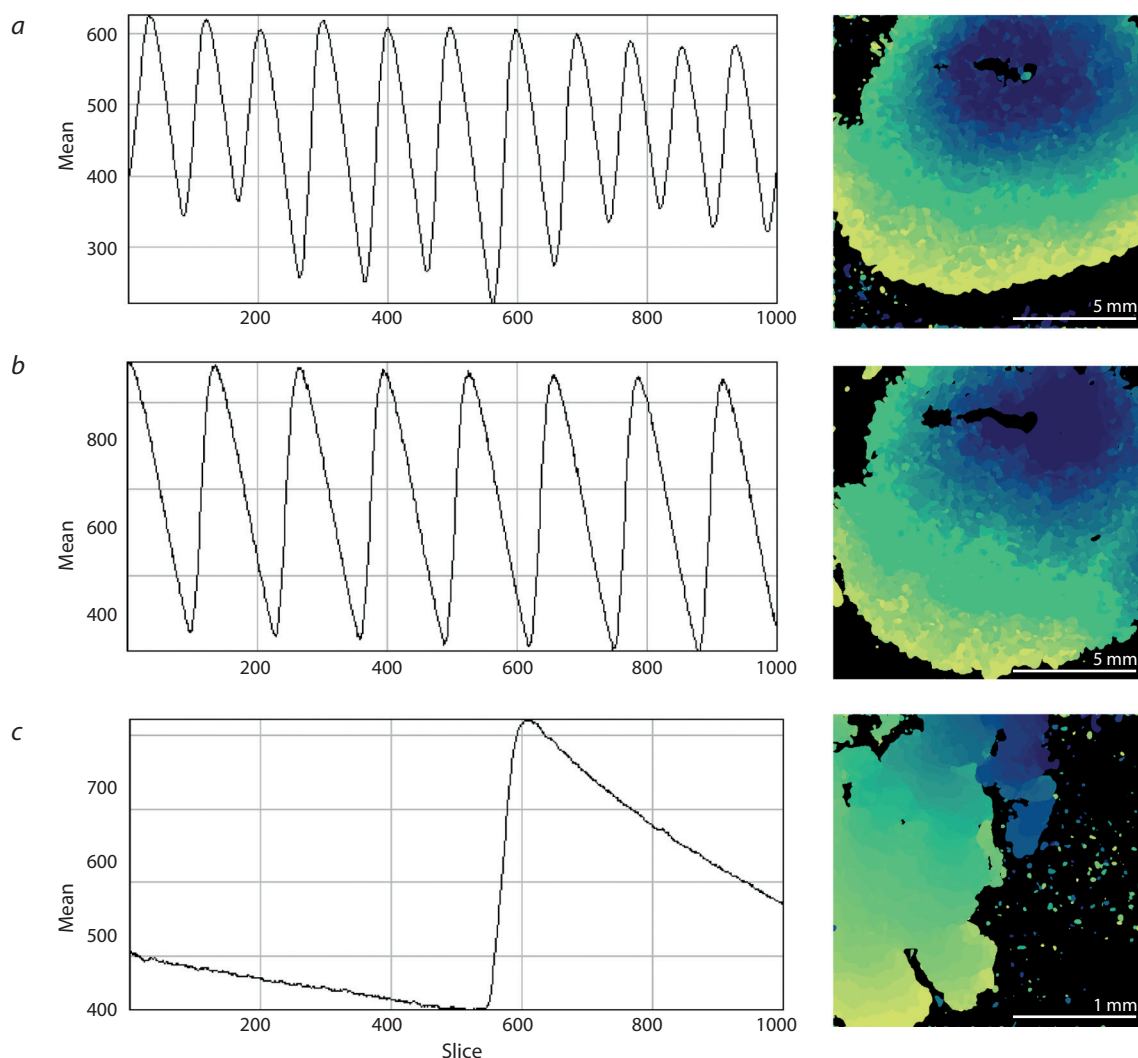


Fig. 4. Phase maps of excitation wave propagation from the monolayer of cardiomyocytes in a 15-mm plate.

(a) Phase map for the propagation of excitation on the monolayer of ISMA6L cells within 50 ms on day 30 of differentiation. The behavior is isotropic. On the left: the fluorescence intensity of fluo-4 (AM), conjugated with the passage of the wave of Ca^{2+} ions. The number of peaks in the graph shows how many times the culture was able to be excited by the electrode stimulus within the record time (8 seconds). Thus, the figure shows the conduct at a stimulus frequency about 1.4 Hz. (b) Phase map for the same sample within 50 ms at a lower frequency, set by the electrode (1 Hz). It is apparent that the wave propagation region is larger; hence, the wave velocity at this frequency is higher. (c) Phase map for the propagation of excitation along the monolayer of if31-5-derived cells on day 19 of differentiation within 1.2 sec. On the left: the propagation velocity is much lower, and repolarization takes significantly longer than in the line without the current IKr mutation.

ствия значительно удлиняется до значений более 600 мс в среднем (рис. 3, a2). Зафиксированы также потенциал-зависимые ионные токи начиная с 14-го дня (рис. 3, б1 и б2). В случае калиевых токов видно, что в линии if31-5 отсутствует быстрая компонента калиевого тока задержанного выпрямления IKr (см. рис. 3, б3).

Формирование проводящих структур подтверждается наличием синхронного проведения, регистрируемого методом оптического картирования. Необходимым моментом при регистрации активности является устойчивое проведение полученной ткани человека. Таким образом, задача стояла в определении момента, когда измерения становятся наиболее правдоподобными и устойчивыми,

т.е. практически не изменяются в зависимости от процессов дальнейшей организации ткани. Проведение волны возбуждения и реакцию на стимуляцию регистрировали с 12-го дня от начала дифференцировки. На линии iSMA6L спонтанная активность была замечена с 8-го–10-го дня в зависимости от культуры. При исследовании культуры с 12-го по 20-й день при помощи электродной стимуляции системой из кругового и точечного электродов было установлено, что культура способна бесперебойно проводить импульсы с частотой порядка 1–1.25 Гц и не усваивает более высокие значения. После 20-го дня культура продолжает активно формироваться и уже улавливает более высокие частоты, вплоть до 1.42 Гц. С 30-го дня культура

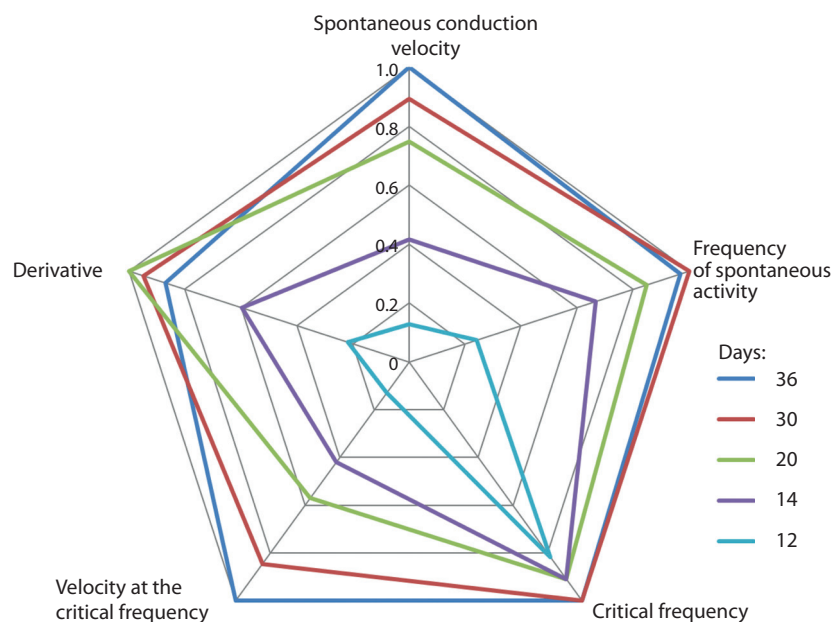


Fig. 5. Radar plot of the properties of the monolayer of iSMA6L-derived cells on different days of differentiation.

The values on each axis are expressed in relative units. Each axis is normalized to the greatest recorded value of the corresponding parameter, taken to be unity.

уже стабильно реагировала на импульсы частотой порядка 1.5 Гц и более, при этом проводила волну возбуждения с утойчивой скоростью, в том числе и при различных частотах. Значение скорости проведения приближалось к 0.3 м/с, что соответствует данным по проведению на срезе сердечной ткани зрелых кардиомиоцитов.

Развитие линии if31-5 происходило медленнее и менее стабильно, однако наблюдались общие с линией iSMA6L тенденции развития, такие как увеличение скорости проведения на более поздние дни дифференцировки. Полученные с помощью оптического картирования данные обрабатывали при использовании программы Wolfram Mathematica 9 для построения фазовых карт, отражающих распространение волны по образцу (рис. 4).

Для определения периода, с которого свойства проведения культуры станут устойчивыми и независимыми от дальнейших процессов развития и формирования ткани, проводилось наблюдение за пятью основными параметрами проведения, полученными с помощью картирования и отражающими такие свойства культуры, как проведение импульса, скорость при различных частотах и критическая частота. На рис. 5 представлена диаграмма, показывающая значения следующих параметров для монослоя клеток iSMA6L на различные дни дифференцировки (каждое отмеченное на оси значение усреднено по измерениям трех образцов): скорость спонтанного проведения, измеренная с помощью программы ImageJ; частота спонтанной активности; критическая частота – максимальная частота электродной стимуляции, улавливаемая культурой без перебоев; скорость при критической частоте; производная – отношение скорости при спонтанном возбуждении к скорости при критической частоте. Замечено, что все пять величин возрастают с течением времени, резкий рост прекращается после 30-го дня: затем различие значений между соседними днями дифференцировки не превышает разницу значений у различных образцов одного и того же дня, это означает, что изменение свойств проведения в дальнейшем слабо зависит от дня дифференцировки.

Обсуждение

Основная проблема, связанная с изучением LQTS, заключается в отсутствии точного механизма формирования реентри, включающего подробное

описание влияния каналопатии на распространение волн возбуждения. Эта проблема усугубляется тем, что результаты экспериментальных моделей на животных не могут быть экстраполированы на людей, например, представители семейства мышинных не обладают быстрым калиевым током (IKr), играющим важную роль в формировании реентри. Открытие индуцированной плюрипотентности привело к созданию принципиально новых методов изучения механизмов сердечных аритмий (и скрининга лекарств) на основе ИПСК (Passier et al., 2008; Gintant et al., 2016). В более ранних исследованиях с использованием технологии ИПСК возникла проблема определения стадии развития, при которой функциональная зрелость дифференцирующих в кардиомиоциты клеток была бы успешно достигнута. В нескольких исследованиях предпринимались попытки определить функциональность этих клеток и характеристики их созревания (Klimanskaya et al., 2008; Mauritz et al., 2008). Однако для изучения аритмий и эффективного тестирования антиаритмических средств одиночных клеток недостаточно, необходимо проводить исследования на сердечной ткани. Таким образом, вопрос ставится о достижении зрелости не клеткой, а всей сердечной тканью.

Наше исследование с использованием метода оптического картирования показало, что для формирования проводящей и полностью функциональной сердечной ткани при направленной кардиальной дифференцировке линии ИПСК iSMA6L требуется около 30 дней. Именно с 30-го дня дифференцировки все ключевые свойства проведения возбуждения становятся устойчивыми и перестают зависеть от дальнейших процессов развития ткани. Так, скорость проведения при спонтанном возбуждении культуры достигает своего максимума в 0.3 м/с, что соответствует значениям скорости проведения среза человеческой сердечной ткани (Kang et al., 2016).

В ходе направленной дифференцировки в кардиомиоциты выявлены принципиальные различия между линиями iSMA6L и if31-5, несущей мутацию, вызывающую врожденный LQTS. Данные patch-clamp и иммуно-

цитохимии показали, что формирование функциональных желудочковых кардиомиоцитов iSMA6L начиналось через 12 дней после запуска дифференцировки. Форма потенциала действия кардиомиоцитов iSMA6L на 12-й день дифференцировки соответствовала таковой желудочковых кардиомиоцитов человека, но потенциал действия характеризовался укороченной длительностью с последующим увеличением до 400 мс к 28-му дню дифференцировки и далее не менялся. Что касается кардиомиоцитов if31-5 с мутацией T613M в гене *KCNH2*, кодирующем α -субъединицу канала быстрой компоненты калиевого канала задержанного выпрямления I_{Kr} , то на раннем этапе дифференцировки клеток потенциал действия имел сначала укороченную форму, а затем к 27-му дню дифференцировки достигал стабильной длительности (более 600 мс). В то время как в кардиомиоцитах if31-5 I_{Na} , $I_{Ca_{L-type}}$ фиксировались уже на ранних этапах дифференцировки (на 14-й день), быстрой компоненты калиевого канала задержанного выпрямления I_{Kr} не обнаружено. Этот факт, по-видимому, и обуславливает увеличенную продолжительность потенциала действия в кардиомиоцитах линии if31-5 по сравнению с кардиомиоцитами iSMA6L.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Science Foundation, project 16-14-10091.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Burridge P.W., Matsa E., Shukla P., Lin Z.C., Churko J.M., Ebert A.D., Lan F., Diecke S., Huber B., Mordwinkin N.M., Plews J.R., Abilez O.J., Cui B., Gold J.D., Wu J.C. Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat. Methods*. 2014;11(8):855-860.
- Campuzano O., Perez-Serra A., Cesar S., Iglesias A., Brugada R. Genetic basis of atrial fibrillation. *Genes & Diseases*. 2016;3(4):257-262.
- El-Sherif N., Turitto G., Boutjdir M., Pilai S., Otte B., Pedalino R. Electrophysiological basis of ECG characteristics of torsades de pointes in long QT syndrome. *Card. Electrophysiol. Clin.* 2014;6(3):433-444.
- Estacion M., Waxman S.G. The response of $Na(V)1.3$ sodium channels to ramp stimuli: multiple components and mechanisms. *J. Neurophysiol.* 2013;109(2):306-314.
- Fast V.G., Kléber A.G. Role of wavefront curvature in propagation of cardiac impulse. *Cardiovasc. Res.* 1997;33(2):258-271.
- Gintant G., Sager P.T., Stockbridge N. Evolution of strategies to improve preclinical cardiac safety testing. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2016;15(7):457-471.
- Grigor'eva E.V., Valetdinova K.R., Ustyantseva E.I., Shevchenko A.I., Medvedev S.P., Mazurok N.A., Maretina M.A., Kuranova M.L., Kiselev A.V., Baranov V.S., Zakian S.M. Neural differentiation of patient-specific induced pluripotent stem cells from patients with a hereditary form of spinal muscle atrophy. *Geny i kletki = Genes & Cells*. 2016;XI(2):70-81. (in Russian)
- Horbach S.P., Halfman W. The ghosts of HeLa: How cell line mis-identification contaminates the scientific literature. *PLoS ONE*. 2017;12(10):e0186281.
- Hou L., Deo M., Furspan P., Pandit S.V., Mironov S., Auerbach D.S., Gong Q., Zhou Z., Berenfeld O., Jalife J.A. Major role for hERG in determining frequency of reentry in neonatal rat ventricular myocyte monolayer novelty and significance. *Circ. Res.* 2010;107(12):1503-1511.
- Itzhaki I., Maizels L., Huber I., Zwi-Dantsis L., Caspi O., Winterstern A., Feldman O., Gepstein A., Arbel G., Hammerman H., Boulos M., Gepstein L. Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011;471(7337):225-229.
- Jervell A., Lange-Nielsen F. Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the QT interval, and sudden death. *Am. Heart J.* 1957;54(1):59-68.
- Kang C., Qiao Y., Li G., Baechle K., Camelliti P., Rentschler S., Efimov I.R. Human organotypic cultured cardiac slices: new platform for high throughput preclinical human trials. *Sci. Rep.* 2016;6:28798.
- Klimanskaya I., Rosenthal N., Lanza R. Derive and conquer: sourcing and differentiating stem cells for therapeutic applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2008;7(2):131-142.
- Lian X., Zhang J., Azarin S.M., Zhu K., Hazeltine L.B., Bao X., Hsiao C., Kamp T.J., Palecek S.P. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions. *Nat. Protoc.* 2013;8(1):162-175.
- Lippiat J.D. Whole-cell recording using the perforated patch clamp technique. *Potassium Channels: Methods and Protocols*. Humana Press, 2009;141-149.
- Ma J., Guo L., Fiene S.J., Anson B.D., Thomson J.A., Kamp T.J., Kolaja K.L., Swanson B.J., January C.T. High purity human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: electrophysiological properties of action potentials and ionic currents. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2011;301(5):H2006-H2017.
- Matsa E., Rajamohan D., Dick E., Young L., Staniforth A., Denning C. Drug evaluation in cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells carrying a long QT syndrome type 2 mutation. *Eur. Heart J.* 2011;32(8):952-962.
- Mauritz C., Schwanke K., Reppel M., Neef S., Katsirntaki K., Maier L.S., Nguemo F., Menke S., Hausteiner M., Hescheler J., Hasenfuss G., Martin U. Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells. *Circulation*. 2008;118(5):507-517.
- Medvedev S.P., Malakhova A.A., Grigor'eva E.V., Shevchenko A.I., Dementyeva E.V., Sobolev I.A., Lebedev I.N., Shilov A.G., Zhimulev I.F., Zakian S.M. Derivation of induced pluripotent stem cells from fetal human skin fibroblasts. *Acta Naturae*. 2010;2(2):102-106.
- Passier R., van Laake L.W., Mummery C.L. Stem-cell-based therapy and lessons from the heart. *Nature*. 2008;453(7193):322-329.
- Pelzmann B., Schaffer P., Bernhart E., Lang P., Mächler H., Rigler B., Koidl B. L-type calcium current in human ventricular myocytes at a physiological temperature from children with tetralogy of Fallot. *Cardiovasc. Res.* 1998;38(2):424-432.
- Schwartz P.J., Periti M., Malliani A. The long QT syndrome. *Am. Heart J.* 1975;89(3):378-390.
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131:861-872.
- Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126:663-676.

Дифференциальный протеомный анализ корней гороха на ранних этапах развития симбиоза с клубеньковыми бактериями

И.В. Леппянен¹, А.Н. Кириенко¹, А.А. Лобов², Е.А. Долгих¹ ✉

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

² Ресурсный центр «Развитие молекулярных и клеточных технологий», научный парк, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

В настоящей работе проведен анализ изменений в протеомном спектре корней гороха *Pisum sativum* L. при инокуляции клубеньковыми бактериями, направленный на выявление новых регуляторов развития симбиоза. Для изучения изменений в протеомном спектре корней гороха использован дифференциальный двумерный (2-D) электрофорез с флуоресцентными метками Cy2 и Cy5. Полученные изображения позволили выявить различия между контрольным вариантом (неинокулированные корни) и корнями, инокулированными ризобиями *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* RCAM 1026 (24 ч после инокуляции). Выявлено и идентифицировано 20 белков, синтез которых усиливался в процессе инокуляции корней гороха клубеньковыми бактериями. Для идентификации белков использовали масс-спектрометрический анализ триптических пептидов на квадруполь-времяпролетном масс-спектрометре, совмещенном с высокоэффективным жидкостным хроматографом. Среди таких белков впервые найдены бета-субъединица G-белка и дисульфид изомеразы/фосфолипазы C, функция которых может быть связана с сигнальной регуляцией симбиоза. Это показывает, что G-белки и фосфолипазы могут играть ключевую роль в развитии ранних стадий симбиоза у гороха. Дальнейшие эксперименты должны выявить, происходит ли взаимодействие бета-субъединицы G-белка с рецепторами к Nod-факторам и как это влияет на дальнейшую передачу сигнала. Среди других белков, изучение которых представляет интерес, обнаружены аннексин D8 и D1, протеинкиназа, взаимодействующая с кальцинерином B, актин-связывающий белок профиллин, ГТФ-связывающий белок Ran1. Они могут быть вовлечены в регуляцию реакций с участием кальция, реорганизацию актинового цитоскелета и другие важные процессы у растений. Изучение роли таких белков-регуляторов в дальнейшем станет основой для понимания сложной системы сигнальной регуляции, которая активируется у растений гороха при взаимодействии с клубеньковыми бактериями.

Ключевые слова: горох *Pisum sativum* L.; бобово-ризобийный симбиоз; протеомный анализ; дифференциальный 2-D-электрофорез.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Леппянен И.В., Кириенко А.Н., Лобов А.А., Долгих Е.А. Дифференциальный протеомный анализ корней гороха на ранних этапах развития симбиоза с клубеньковыми бактериями. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(2):196-204. DOI 10.18699/VJ18.347

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Leppyanen I.V., Kirienko A.N., Lobov A.A., Dolgikh E.A. Differential proteome analysis of pea roots at the early stages of symbiosis with nodule bacteria. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(2):196-204. DOI 10.18699/VJ18.347 (in Russian)

Received 09.12.2017
Accepted for publication 19.01.2018
© AUTHORS, 2018

✉ e-mail: dol2helen@yahoo.com

Differential proteome analysis of pea roots at the early stages of symbiosis with nodule bacteria

I.V. Leppyanen¹, A.N. Kirienko¹, A.A. Lobov², E.A. Dolgikh¹ ✉

¹ All-Russian Scientific Research Institute of Agricultural Microbiology, Pushkin, St. Petersburg, Russia

² Resource Center "Development of Molecular and Cellular Technologies", Science Park, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

In this paper, we have analyzed changes in the proteomic spectrum of pea *Pisum sativum* L. roots during inoculation with rhizobial bacteria with the aim of revealing new regulators of symbiosis development. To study the changes in the proteome spectrum of pea roots, a differential two-dimensional (2-D) electrophoresis was performed using fluorescent labels Cy2 and Cy5. The images obtained made it possible to identify differences between the control variant (uninoculated roots) and the root variant after inoculation with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* RCAM 1026 (24 hours after treatment). 20 proteins were revealed and identified, the synthesis of which was enhanced during the inoculation of pea roots by nodule bacteria. To identify the proteins, a mass spectrometric analysis of tryptic peptides was performed on a quadrupole-time-of-flight mass spectrometer combined with a high-performance liquid chromatograph. Among such proteins, the beta-subunit of the G protein and the disulfide isomerase/phospholipase C were first found, whose function can be related to the signal regulation of symbiosis. This indicates that G-proteins and phospholipases can play a key role in the development of early stages of symbiosis in peas. Further experiments are expected to show whether the beta-subunit of the G protein interacts with the receptors to Nod factors, and how this affects the further signaling. Other proteins that might be interesting were annexin D8 and D1, protein kinase interacting with calcinerin B, actin-binding protein profilin, GTP-binding protein Ran1. They may be involved in the regulation of reactions with calcium, the reorganization of the actin cytoskeleton and other important processes in plants. The study of the role of such regulatory proteins will later become the basis for understanding the complex system of signal regulation, which is activated in pea plants by interaction with nodule bacteria.

Key words: pea *Pisum sativum* L.; legume-rhizobial symbiosis; proteomic analysis; differential 2-D electrophoresis.

Результатом взаимодействия бобовых растений с почвенными азотфиксирующими бактериями пор *Rhizobiales* является развитие новых специализированных латеральных органов, корневых клубеньков, в которых осуществляется процесс фиксации азота (Schultze, Kondorosi, 1998). В ходе последовательных взаимодействий между растениями и бактериями реализуется способность партнеров влиять на обмен веществ и защитные системы, пролиферацию и дифференцировку клеток, морфогенез. Такие процессы предполагают существенные изменения в качественном и количественном составе белков, участвующих в формировании новых органов у растений. Однако исследований по изучению изменений спектра белков при развитии симбиоза с ризобиями у бобовых растений выполнено не много (Morris, Djordjevic, 2001; Bestel-Corre et al., 2002; Schenkluhn et al., 2010; Marx et al., 2016).

В основе формирования бобово-ризобияльного симбиоза лежит обмен сигналами между партнерами. Выделяемые бактериями сигнальные молекулы, липохито-олигосахариды, Nod-факторы (nodulation – клубенькообразование), запускают комплекс специфичных ответов в эпидерме, перикле и коре корня растения, тем самым обеспечивая основу для последующего проникновения ризобий в клетки растений, развития инфекции и морфогенеза клубеньков. Как показали исследования последних лет, в узнавание хитоолигосахаридных сигнальных молекул могут быть вовлечены специализированные рецепторы, отличительной особенностью которых является присутствие LysM-мотивов во внеклеточных доменах (Morris, Djordjevic, 2001; Marx et al., 2016). У гороха – основного объекта наших исследований – предполагаемыми рецепторами к Nod-факторам могут быть LysM-рецептор-подобные киназы SYM10, K1, SYM37 и LYR3, которые, объединяясь в комплексы, контролируют развитие разных этапов симбиоза (Madsen et al., 2003; Zhukov et al., 2008; Malkov et al., 2016). Активация под влиянием рецепторов компонентов сигнального пути необходима для развития в конечном итоге кальциевых волн в ядре и околядерном пространстве, что определяет стимуляцию ряда транскрипционных факторов и их взаимодействие с генами-мишенями.

Один из первых компонентов сигнального пути – LRR-рецептор-подобная киназа (LRR-ППК, от англ. leucine-rich repeats), принадлежащая к семейству рецепторов с лейцин-богатыми повторами во внеклеточном домене, которая у гороха кодируется геном *Sym19* (рис. 1) (Endre et al., 2002). Эксперименты по локализации белка показали его присутствие в цитоплазматической мембране клеток эпидермы корня. LRR-ППК SYM19 взаимодействует непосредственно с комплексом рецепторов к Nod-факторам, что определяет возможность передачи сигнала к компонентам сигнального пути в цитоплазме. Эти компоненты участвуют в развитии кальциевого ответа, но еще не выявлены у бобовых растений.

Как регулируется выход кальция из внутриклеточных депо и генерация Ca^{2+} -волн в клетках эпидермы бобовых растений – остается неясным, но этот процесс может быть сходен с тем, который наблюдается в клетках животных. Активация рецепторов, сопряженных с G-белками, приводит к диссоциации тримерной молекулы G-белка на

две функциональные субъединицы: альфа-субъединицу, содержащую GTP, и бета-, гамма-комплекс. Далее альфа-субъединица взаимодействует с ферментами фосфолипазой C и фосфолипазой D, которые гидролизуют находящийся в мембране фосфатидилинозитол с образованием диацилглицерола и инозитол-1,4,5-трифосфата. Появление этих вторичных мессенджеров приводит к связыванию с мишенями, находящимися на поверхности внутриклеточных депо кальция и, как следствие, генерации периодических выбросов кальция – Ca^{2+} -волн. Отдельные факты, подтверждающие эту гипотезу, получены для бобовых растений. Так, эксперименты с ингибиторами показали, что G-белок, фосфолипаза C и фосфолипаза D могут быть вовлечены в активацию кальциевого сигнального каскада при симбиозе (den Hartog et al., 2001; D'Haese, Holsters, 2002). Таким образом, в контроле изменений концентрации кальция в клетках участвуют пока не идентифицированные регуляторы внутриклеточных депо кальция.

Однако следующий компонент, который влияет на содержание кальция уже в ядре, идентифицирован у бобовых растений. В формировании Ca^{2+} -волн в ядре клеток важную роль играет АТФ-регулируемая кальциевая помпа MCA8 (АТФаза SERCA-типа), локализованная в ядерной оболочке (см. рис. 1) (Caoen et al., 2011), и калиевый канал, кодируемый геном *Sym8* у гороха (Ane et al., 2004). Наличие участков связывания с другими белками в SYM8 позволяет рассматривать эти катионные каналы как составную часть многокомпонентного комплекса.

К развитию Ca^{2+} -волн имеют отношение также белки нуклеопорины, образующие ядерную пору (см. рис. 1). По аналогии с клетками животных в состав ядерной поры должны входить несколько белков. В настоящее время среди них выявлены NUP133 (Kanamori et al., 2006), NUP85 (Saito et al., 2007) и NENA (Groth et al., 2010). Мутации по генам *nup85*, *nup133* и *nena* блокируют развитие кальциевых волн, которые активируются при запуске Nod-фактор-зависимого сигнального каскада, что подтверждает важную роль этих белков в генерации кальциевого сигнала. Изменения в концентрации Ca^{2+} в ядре активируют кальций, кальмодулин-зависимую протеинкиназу CcCaMK (calcium/calmodulin-dependent protein kinase), кодируемую геном *Sym9* у гороха (Levy et al., 2004). В свою очередь, CcCaMK фосфорилирует транскрипционный фактор IPD3/CYCLOPS (Ovchinnikova et al., 2011), который взаимодействует с набором других транскрипционных факторов NSP1, NSP2, NIN и CAAT-боксы-связывающими NF-YA1, NF-YA2, необходимыми для инициации и дальнейшего развития инфекции (формирования инфекционной нити в эпидерме) и органогенеза клубенька (см. рис. 1) (Smit et al., 2005; Marsh et al., 2007; Oldroyd, Downie, 2008).

Таким образом, в процессе передачи сигнала от Nod-факторов у растений могут быть задействованы дополнительные белки-регуляторы, которые в настоящее время остаются еще не известными. Одним из возможных подходов для выявления белков может быть дифференциальный протеомный анализ корней гороха при инокуляции ризобиями. Однако исследований по протеомному анализу растений гороха при симбиозе с ризобиями практически не проводилось. Проанализирован только протеом изо-

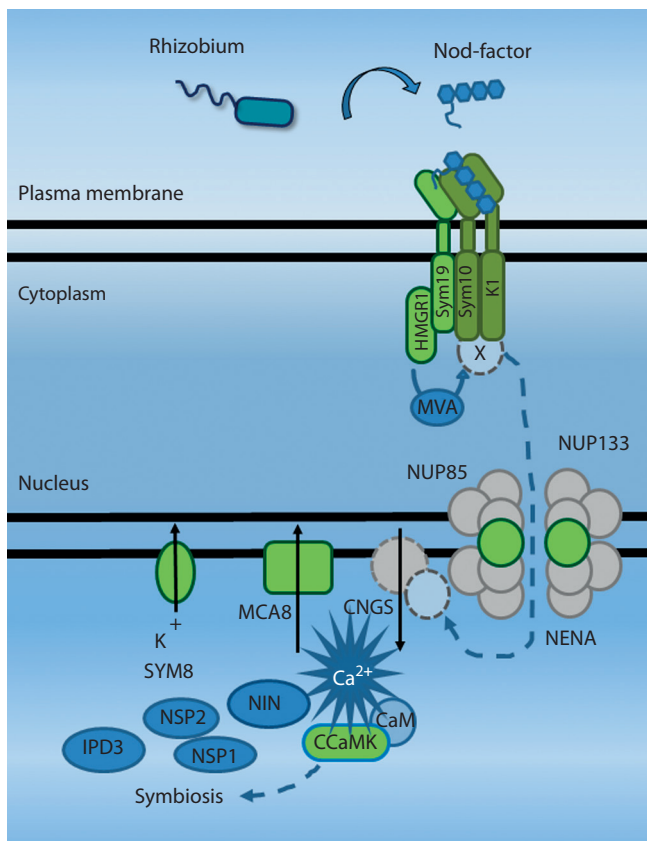


Fig. 1. Signal transduction in the development of the legume–rhizobium symbiosis.

SYM10, K1, LysM receptors to Nod factors; SYM19, LRR receptor-like kinase; MCA8; ATP-regulated calcium pump (SERCA ATPase); HMGR1, mevalonate synthase (MVA: mevalonate, a second messenger); CNGS, calcium pump; SYM8, potassium channel; NUP133, NUP85, and NENA, nucleoporin proteins; CCaMK, calcium and calmodulin-dependent protein kinase; IPD3, NSP1, NSP2, and NIN, transcription factors.

лированных из клубеньков гороха бактериоидов (Saalbach et al., 2002). У гороха ранее были исследованы протеомы корней, пораженных паразитической *Orobanchе crenata* и микосфереллой *Mycosphaerella pinode* (Castillejo et al., 2010, 2011). Изучено влияние салициловой и жасмоновой кислот на белковый состав корней и листьев гороха (Тарчевский и др., 2010; Тарчевский, Егорова, 2015), а также температурного стресса на развитие вегетативных органов и семян (Bourgeois et al., 2009; Dumont et al., 2011). В нашей работе проведен дифференциальный протеомный анализ корней гороха на ранних этапах развития симбиоза с клубеньковыми бактериями *R. leguminosarum* bv. *viciae* RCAM 1026, направленный на выявление новых регуляторов пути, активируемых сигнальными молекулами эндосимбионта.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы. Ризобийный штамм *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* RCAM 1026 (WDCM 966) выращивали в жидкой среде В- (van Brussel et al., 1977) при 28 °С с добавлением 0.5 мг/мл антибиотика стрептомицина. Для инокуляции использовали 1 мл суспен-

зии бактерий *R. leguminosarum* bv. *viciae* RCAM 1026 (OD600 = 0.5) на проросток.

Условия выращивания растений и подготовки материала. Семена гороха *Pisum sativum* L. сорта Frisson стерилизовали 5 мин в серной кислоте, после этого три раза промывали дистиллированной водой и проращивали на 1 % водном агаре в темноте в течение четырех суток. Проростки переносили в горшки со стерильным вермикулитом, политым раствором Jensen (van Brussel et al., 1982). Инокуляцию проростков проводили штаммом *R. leguminosarum* bv. *viciae* RCAM 1026, OD600 ~0.5 по 1 мл на проросток. В качестве контроля использовали неинокулированные проростки, собранные на тех же сроках после проращивания. Растения находились в фитотроне при 21 °С, 16-часовом световом периоде, 60 % влажности. Для анализа собирали фрагменты главных корней, соответствующие зоне восприимчивости к ризобийной инфекции. Материал замораживали в жидком азоте и хранили при –80 °С.

Выделение суммарного белка из корней гороха. Для выделения белков из корней гороха использовали модифицированный метод (Dam et al., 2013; Kirienko et al., 2017). 100 мг корней растирали в жидком азоте, затем к материалу добавляли буфер для экстракции (0.1 М трис-HCl (pH 8.0), 30 % сахароза, 10 мМ дитиотрейтол (ДТТ), 2 % додецилсульфат натрия (ДСН), смесь протеазных ингибиторов (Sigma, США)) и проводили экстракцию при +4 °С. Центрифугировали 15 мин при 12000 g, надосадочную жидкость смешивали в соотношении 1:1 с фенолом (pH 8.0) (Invitrogen, США), центрифугировали при 12000 g 5 мин. Верхнюю фазу отбирали, для осаждения белков к ней добавляли пять объемов охлажденного 100 мМ ацетата аммония в метаноле и инкубировали 30 мин при –20 °С. Центрифугировали 5 мин при 12000 g. Осадок промывали два раза 100 мМ ацетатом аммония в метаноле и дважды 80 % ацетоном. Осадок сушили на воздухе и растворяли в буфере для изофокусировки (25 мМ трис-HCl (pH 8.0), 9 М мочевины, 4 % CHAPS, 50 мМ ДТТ, 0.2 % амфолиты (BioRad Laboratories, США)). Концентрацию белка измеряли по методу (Bradford, 1976).

Изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ). Двумерный электрофорез белков проводили с использованием дифференциальной окраски образцов разными флуоресцентными метками (дифференцирующий двумерный электрофорез, DIGE) (Voss, Haberl, 2000). Для этого образцы конъюгировали в течение 30 мин на льду с активированными эфирами флуоресцентных красителей, разработанными для двумерного электрофореза Cyanine 2 или Cyanine 5 (Cy2 и/или Cy5) (Lumiprobe, Россия) в различных комбинациях. Раствор для инкубации содержал 400 пМ каждого красителя, растворенного в диметилформамиде в течение 30 мин на льду. С момента конъюгации образцов с флуоресцентными метками все манипуляции проводили в темноте. Реакцию останавливали внесением 10 мМ L-лизина (Sigma-Aldrich, США) с последующей инкубацией в течение 10 мин на льду. После этого контрольные и экспериментальные образцы смешивали, добавляли ДТТ и амфолиты (50 мМ ДТТ, 0.2 % амфолитов (BioRad Laboratories, США)). Проводили пассивную регидратацию гелей с иммобилизованным

градиентом pH (BioRad Laboratories, США) в течение ночи при комнатной температуре. Общее количество образца, наносимого на 18 см гель (pH 3-10, BioRad Laboratories, США), составило 250 мкг.

ИЭФ проводили в приборе Protean IEF (BioRad Laboratories, США) при температуре 20 °C, образцы обессоливали при 250 В в течение 15 мин, после этого напряжение линейно увеличивалось до 4000 В в течение 2 ч, затем ИЭФ проводили при увеличении напряжения до 10000 В и ограничении силы тока до 35 мА на геле. После процедуры ИЭФ белки разделяли во втором направлении в полиакриламидном геле (ПААГ). Перед проведением электрофореза восстановление белков проводили в буфере с ДТТ (6 М мочевины, 0.375 М трис, pH 8.8, 2 % ДСН, 20 % глицерина, 2 % ДДТ) в течение 10 мин с последующим алкилированием в буфере с иодацетамидом (6 М мочевины, 0.375 М трис, pH 8.8, 2 % SDS, 20 % глицерина, 2.5 % иодацетамида) в течение 15 мин.

Электрофорез белков в полиакриламидном геле. Второе направление двумерного электрофореза проводили в трис-глициновом буфере по Лэммли (25 мМ трис-HCl, 192 мМ глицина, 0.1 % SDS, pH 8.3) в 15 % ПААГ с использованием 4 % концентрирующего геля при силе тока 16 мА для концентрирующего геля и 24 мА на разделяющий гель. После разделения белков в двух направлениях гели визуализировали с использованием лазерного сканера Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare, Германия). Гели промывали три раза в течение 5 мин водой MQ и окрашивали раствором SimpleBlue (Invitrogen, США) в соответствии с протоколом изготовителя. Для выявления дифференциальных белков разные флуоресцентные каналы (Cy2 и Cy5) одного геля окрашивали отличающимися псевдоцветами, после этого получали наложенное изображение. Анализ изображений осуществляли с помощью программы ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>).

Трипсинолиз белков и масс-спектрометрический анализ. После окрашивания фрагменты геля, содержащие целевые белки, вырезали и измельчали скальпелем. Для вымывания красителя и ДСН фрагменты геля трижды промывали раствором 30 мМ трис, pH 8.2 в 50 % ацетонитриле в течение 15 мин при комнатной температуре и постоянном помешивании. Для регидратации к гелю добавляли 150 мкл 100 % ацетонитрила (LiChrosolv, Германия), затем ацетонитрил удаляли, пробы сушили на воздухе 10 мин. При трипсинолизе белки регидратировали в растворе трипсина (20 нг/мкл трипсина, 30 мМ трис, pH 8.2) на льду в течение одного часа, избыток раствора трипсина удаляли и вносили 50 мкл буфера (30 мМ трис, pH 8.2). Трипсинолиз проводили в течение одного часа при 56 °C. Триптические пептиды экстрагировали из геля 50 % ацетонитрилом, подкисленным 0.1 % муравьиной кислотой. Полученный раствор высушивали в вакуумном концентраторе CentriVap (Labronco) при 4 °C и растворяли в фазе А для последующей хроматографии (5 % ацетонитрил, 0.1 % муравьиная кислота). Масс-спектрометрический анализ триптических пептидов проводили на квадруполь-время-пролетном масс-спектрометре Agilent ESI-Q-TOF 6538 UHD (Agilent Technologies), совмещенном с высокоэффективным жидкостным хроматографом Agilent 1260 (Agilent Technologies). Хроматографическое разделение

осуществляли в системе вода–ацетонитрил в присутствии 0.1 % муравьиной кислоты (фаза А – 5 % ацетонитрил, 0.1 % муравьиная кислота; фаза Б – 90 % ацетонитрил, 0.1 % муравьиная кислота) в градиенте ацетонитрила (от 5 до 60 % фазы Б за 25 мин и до 100 % фазы Б за 5 мин) на колонке Zorbax 300SB-C18 (Agilent Technologies; 3.5 мкм, внутренний диаметр 0.10 мм, длина 150 мм) со скоростью потока 15 мкл/мин.

Анализ ионов проводили с частотой три спектра в секунду в режиме автоматического tandemного масс-спектрометрического (МС/МС) анализа с материнскими ионами 2+, 3+, n+. Анализ данных осуществляли с помощью программы Spectrum Mill MS Proteomic Workbench (Rev B.04.00.127; Agilent Technologies) с поиском по базе данных UniProt и базе данных, полученной на основе доступных транскриптомов гороха <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/wgs/?val=GDTM01000000>; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/wgs/?val=GDTL01&display=contigs&page=1>, в режиме идентификации с учетом возможной ошибки определения массы материнских ионов не более 20 ppm. Оценку достоверности данных проводили с использованием процедуры автовалидации при пороговом значении отсека ложноположительных результатов (false discovery rate – FDR) в 1 %.

Результаты и обсуждение

Для изучения изменений в протеомном спектре корней гороха нами проведен дифференциальный двумерный (2-D) электрофорез с использованием флуоресцентных меток Cy2 и Cy5. Полученные таким образом изображения позволили выявить различия между контрольным вариантом (неинокулированные корни) и корнями, инокулированными ризобиями *R. leguminosarum* bv. *viciae* RCAM 1026 (24 ч после инокуляции). В результате двух независимо проведенных экспериментов выявлены и идентифицированы 20 белков, синтез которых усиливался в процессе инокуляции корней гороха клубеньковыми бактериями (таблица и рис. 2). Среди них идентифицированы регуляторы синтеза белков и полисахаридов, а также белки, контролирующие защитные реакции растений, что согласуется с полученными ранее данными при изучении протеомов корней и клубеньков других бобовых растений (Marx et al., 2016). Однако наибольший интерес для нас представляли белки, которые могут потенциально участвовать в сигнальной регуляции развития симбиоза.

Среди выявленных белков, синтез которых увеличивался в корнях гороха при взаимодействии с клубеньковыми бактериями, идентифицированы с помощью масс-спектрометрического анализа аннексин D8 и аннексин D1 (см. таблицу и рис. 2). Аннексины относятся к семейству кальций-зависимых белков, которые способны связывать фосфолипиды. В состав этого семейства входит около 160 белков, выявленных у самых разнообразных видов растений (Gerke, Moss, 2002). Все аннексины имеют сходную структуру, представленную входящими в состав белка четырьмя-восемью консервативными доменами, состоящими из 70 остатков аминокислот, так называемыми аннексиновыми повторами (Moss, Morgan, 2004). Эти домены позволяют аннексинам взаимодействовать с мембранами Ca²⁺-зависимым образом или формиро-

Proteins whose synthesis in pea roots is enhanced after inoculation with nodule bacteria (24 h after inoculation)

Gel spot no.	IDs of the transcript in transcriptome bases for pea roots and nodules	IIDs of homologs in NCBI	Protein function
1	GDTL01033452.1	XM_003598600.2	Annexin d8 of <i>M. truncatula</i>
2	GDTL01002621.1	XM_013604591.1	Gamma subunit of translation elongation factor EF1B of <i>M. truncatula</i>
3	GDTL01020570.1	KJ808806.1 AHX83821.1	Heat shock protein HSP4 of <i>C. arietinum</i> / Heat shock protein HSP70 of <i>M. truncatula</i>
4	GDTL01005518.1	XM_013605823.1	Disulfide isomerase/phospholipase C of <i>M. truncatula</i>
5, 25	GDTM01032258.1	XM_003625987.2	S-Adenosyl-methionin synthase of <i>M. truncatula</i>
6	GDTL01025284.1	XM_003629562.2	S-Adenosyl-L-homocysteine hydrolase of <i>M. truncatula</i>
7	GDTL01011909.1	AB003549.1	F1 ATPase of <i>P. sativum</i>
8	GDTL01012229.1	XM_003616132.2	UTP-Glucose-1-phosphate uridylyl transferase of <i>M. truncatula</i>
9	GDTM01040593.1	XM_013598882.1	Late embryogenesis abundant protein LEA of <i>M. truncatula</i>
10	GDTL01000457.1	XM_013602207.1	3,5-Epimerase-4-reductase of <i>M. truncatula</i>
11, 13	GDTM01005945.1	XM_004516121.2	Annexin D1 (LOC101505987) of <i>C. arietinum</i>
12	GDTL01033302.1	XM_003631023.2	Beta subunit of the GTP-binding protein (beta subunit of the G protein) of <i>M. truncatula</i>
14	GDTL01014419.1	U84198.1	Lipoxygenase of <i>P. sativum</i>
15	GDTM01017555.1	U65421.1	Pathogenesis-related protein PR10 of <i>P. sativum</i>
16	GDTL01001386.1	XM_003630650.2	Profilin of <i>M. truncatula</i>
23	GDTM01018991.1	X71388.1	Nucleoside diphosphate kinase ndk-p1 of <i>P. sativum</i>
24	GDTM01011284.1	L47968.1 EF208905	Callus protein P23/calcinerin B-interacting protein kinase of <i>P. sativum</i>
26	GDTM01030585.1	Z25540.1	Porin of <i>P. sativum</i>
27	GDTM01007003.1	EF194277.1	GTP-binding protein Ran1/TC4 (small G protein) of <i>P. sativum</i>

вать потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы (Pollard et al., 1990). В пользу этого предположения свидетельствуют результаты экспериментов по способности аннексинов формировать ионные каналы в искусственных мембранах.

Анализ литературных данных показал присутствие аннексина D8 (MtANN8) среди дифференциально синтезируемых белков близкого вида бобовых растений люцерны слабоусеченной *Medicago truncatula*, формирующей симбиоз с клубеньковыми бактериями *Sinorhizobium meliloti* (Marx et al., 2016). Вероятно, аннексин D8 гороха *P. sativum* L. может выполнять сходную функцию с MtANN8 *M. truncatula*. Ранее другой аннексин, D1 (MtANN1), был выявлен и изучен в корнях *M. truncatula*, инокулированных ризобиями (Niebel et al., 1998). Индукцию экспрессии *MtAnn1* гена наблюдали в формирующихся клубеньках на 4-й и 16-й дни после инокуляции *S. meliloti*, но максимального уровня она достигала через 24 ч, что соответствовало нашим результатам для гороха. Гибридизация *in situ* показала локализацию *MtAnn1* в преинфекционной и инфекционной зоне II корневых клубеньков. Это свидетельствовало об участии аннексина D1 в контроле ранних стадий развития симбиоза. Реконбинантный MtANN1 связывался с мембраной кальций-зависимым способом и формировал канал, который мог проводить ионы K^+ и Na^+ через билипидный слой с высокой эффективностью (Kodavali et al., 2013).

Интересно, что эксперименты на растениях *M. truncatula*, обработанных экссудатами гриба арбускулярной микоризы *Rhizophagus irregularis*, также формирующего симбиозы с растениями, показали, что аннексин активируется и в ответ на действие сходных по структуре сигнальных молекул грибов несультатированных липохитоолигосахаридов Мус-факторов (24 ч обработки) (Sun et al., 2015). Причем индукция MtANN1 Мус-факторами зависела от транскрипционных факторов NSP1, NSP2 и RAM1 (Sun et al., 2015). Эти данные позволяют предположить, что аннексины могут играть существенную роль в сигнальной регуляции развития симбиоза гороха не только с азотфиксирующими бактериями, но и с грибами арбускулярной микоризы.

Среди других выявленных белков большой интерес для нас представляла бета-субъединица гетеротримерного ГТФ-связывающего G-белка (см. таблицу и рис. 2). При активации лигандом рецептора, связанного с G-белком, состоящим из трех субъединиц, альфа, бета и гамма ($\text{G}\alpha$, $\text{G}\beta$ и $\text{G}\gamma$), происходит замещение гуанозиндифосфата (ГДФ) на гуанозинтрифосфат (ГТФ) в $\text{G}\alpha$ -субъединице. Это изменяет ее конфигурацию и приводит к диссоциации комплекса и отделению димера $\text{G}\beta\gamma$ (из двух субъединиц — бета и гамма), который независимо активирует сигнальный путь, включающий фосфолипазы C и D, ионные каналы и митоген-активируемые протеинкиназы. Активность

гетеротримерного G-белка находится под контролем так называемого регулятора сигнального домена (regulator of G-protein signaling domain, RGS), который контролирует стабильность комплекса.

Общее количество разных субъединиц G-белка варьирует у разных растений. Например, у арабидопсиса *Arabidopsis thaliana* выявлено по одной G α - и G β -субъединице, но две G γ -субъединицы (Mason, Botella, 2000). В геноме риса найдено по одной копии гена, кодирующей G α -, G β - и G γ -субъединицы. Напротив, в геноме бобового растения сои *Glycine max* L. обнаружено большее количество генов, кодирующих субъединицы G-белков 4 G α , 4 G β и 12 G γ (Choudhury et al., 2011).

Известно, что G-белки участвуют во множестве процессов у растений: органогенезе (Ullah et al., 2003), восприятии света (Chen, 2008), развитии защитных реакций при иммунном ответе (Zhang et al., 2012). G-белки могут быть вовлечены в сигнальные пути, активируемые фитогормонами – абсцизовой кислотой, брассиностероидами и ауксинами – при прорастании семян и на ранних стадиях развития проростков (Subramaniam et al., 2016).

Недавно для сои была показана ключевая роль G-белков в симбиозе. Существенное усиление синтеза G-белков, представленных двумя бета-субъединицами, G β 3 и G β 4, выявлено в клубеньках, формирующихся при инокуляции растений бактериями *Bradyrhizobium japonicum* (Choudhury, Pandey, 2015). Эксперименты по РНК-интерференции *GmG β 3* и *GmG β 4* показали снижение количества клубеньков на корнях растения, что свидетельствует об их положительном влиянии на формирование симбиотических органов у сои. Напротив, альфа-субъединицы G α могут являться негативными регуляторами формирования клубеньков. Возможность формирования комплекса между альфа-субъединицей G α и рецептором GmNFR1 к Nod-факторам показана в разных гетерологичных системах (Choudhury, Pandey, 2015). В этом случае GmNFR1 может фосфорилировать и активировать RGS, который поддерживает альфа-субъединицу G α -белка в неактивной конформации, что позволяет развиваться симбиозу (Choudhury, Pandey, 2015).

В результате выполненных нами экспериментов удалось показать увеличение синтеза бета-субъединицы G-белка в корнях гороха при инокуляции. Это указывает на то, что G-белки могут играть ключевую роль в развитии ранних стадий симбиоза у гороха, вероятно, через взаимодействие с рецептором к Nod-факторам. Дальнейшие эксперименты должны показать, происходит ли взаимодействие бета-субъединицы G-белка с рецепторами к Nod-факторам и как это влияет на развитие симбиоза у гороха. Такие исследования позволят найти другие компоненты, которые вовлечены в передачу сигнала от G-белка.

Одним из таких потенциальных компонентов может быть выявленная нами дисульфид изомеразы/фосфолипаза С. В дальнейшем предстоит выяснить, будет ли данная фосфолипаза С активироваться G-белком.

Следует отметить, что помимо гетеротримерного G-белка в корнях гороха увеличивался синтез другого мономерного ГТФ-связывающего Ran-белка (малого Ran-белка) (см. таблицу и рис. 2). Надсемейство малых ГТФ-связывающих белков (называемое также надсемейством Ras)

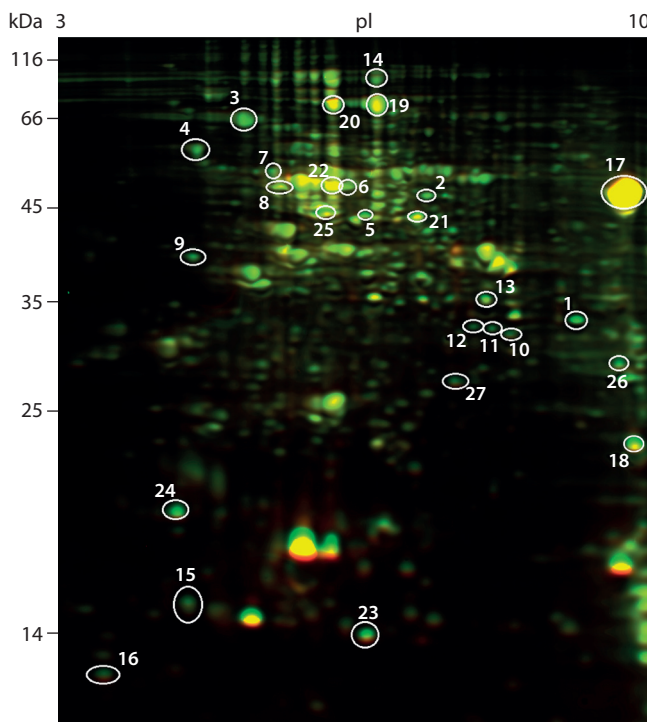


Fig. 2. Differential proteomic analysis of pea (*Pisum sativum* L.) on inoculation with nodule bacteria.

Spots 1–16 and 23–27 were cut out of the gel and identified as proteins whose synthesis is enhanced by the inoculation. Spots 17–22 were cut out to identify constitutively synthesized proteins.

делится на пять семейств у дрожжей и животных (Rab, Ras, Arf, Rho и Ran), однако у растений семейство Ras не обнаружено (Rivero et al., 2017). Эти белки являются регуляторами многих клеточных процессов. Малые ГТФ-связывающие Ran-белки участвуют в везикулярном транспорте, передаче сигнала в клетках, перестройках цитоскелета и контроле митоза (контролируют работу структур, которые разделяют хромосомы между дочерними клетками при клеточном делении). У растений (арабидопсис) идентифицированы малые RanBP1 и RanGAP белки (Ach, Gruissem, 1994; Rivero et al., 2017). RanBP1 имеет высокий уровень сходства с гомологичными белками животных и дрожжей, в то время как RanGAP обладает рядом уникальных доменов (N-концевым доменом, который определяет локализацию в оболочке ядра клеток) и участвует в формировании митотических структур в клетках растений.

Выявленный нами малый ГТФ-связывающий белок PsRAN1 ранее уже был обнаружен у гороха, показана его важная роль в органогенезе корней (Lee et al., 2008). Большой интерес может представлять изучение роли PsRAN1 белка, найденного нами в протеоме корней гороха при заражении ризобиями, в контроле развития симбиотических клубеньков.

Среди белков, синтез которых усиливается при инокуляции, обнаружен профилин, который является актин-связывающим белком, участвующим в реорганизации актинового цитоскелета (см. таблицу и рис. 2). Для профилина экспериментально доказана возможность связывания с

актином (Valenta et al., 1993). Существенные изменения в организации цитоскелета наблюдаются при развитии инфекционных нитей, с помощью которых клубеньковые бактерии заражают клетки растений, а также при органогенезе клубеньков, что оказывает важное влияние на развитие симбиоза (Brewin, 1991). У бобовых профилин впервые найден у фасоли *Phaseolus vulgaris* L., изучена его локализация в клубеньках (Vidali et al., 1995). Однако у других бобовых роль профилинов при симбиозе не изучали.

Увеличение синтеза белка позднего эмбриогенеза (late embryogenesis abundant (LEA) protein) (см. таблицу и рис. 2), выявленное нами в корнях гороха при инокуляции, согласуется с ранее полученными данными для гомологичного LEA белка при анализе протеома корней и клубеньков люцерны слабоусеченной *M. truncatula* (Marx et al., 2016). Существенное усиление синтеза этого белка наблюдали в клубеньках *M. truncatula* на поздних стадиях развития (Marx et al., 2016). Сходным образом анализ данных по изучению транскриптомов позволил обнаружить несколько транскриптов, кодирующих LEA белки, экспрессия которых усиливается при развитии клубеньков бобовых растений *M. truncatula* и сои *Glycine max*.

Известно, что белки позднего эмбриогенеза синтезируются при созревании семян и в условиях водного дефицита. Они являются гидрофиллинами и защищают другие белки, в частности ферменты, от денатурации и агрегации в условиях недостатка воды (Battaglia et al., 2008). Кроме того, показано накопление LEA белков в меристемах растений, в том числе в апикальной меристеме главного корня и боковых корней (Colmenero-Flores et al., 1999). Такая локализация LEA белков позволяет предположить их участие в защите меристематических клеток от повреждений. Этим, вероятно, объясняется присутствие LEA белков в формирующейся меристеме клубеньков. Однако остается не ясным, какую именно роль выполняют эти белки в клубеньках, что требует дальнейшего изучения.

При развитии симбиоза с клубеньковыми бактериями у бобовых растений активируются защитные реакции, обычно в течение 24–48 ч после инокуляции или обработки сигнальными молекулами Nod-факторами (Ramu et al., 2002; Nakagawa et al., 2011). Например, у люцерны *M. truncatula* на ранних сроках после инокуляции наблюдали усиление экспрессии генов, кодирующих защитные ферменты, такие как халконсинтаза, фенилаланин аммоний-лиаза и изофлавоноредуктаза (участвуют в синтезе фитоалексинов), а также белков, связанных с патогенезом PR6 и PR10 (pathogenesis related proteins) (Savouré et al., 1997). У другого бобового растения, *L. japonicus*, наблюдали увеличение экспрессии генов, кодирующих пероксидазу, хитиназу и транскрипционные факторы ERF и WRKY-семейств (Nakagawa et al., 2011). Однако при дальнейшем развитии симбиоза происходит подавление защитных реакций.

Действительно, анализ результатов выполненных нами экспериментов показал, что в протеоме инокулированных корней гороха наблюдается усиление синтеза белков PR10 и HSP70, а также липоксигеназы, имеющих отношение к развитию защитных реакций. Активация защитных реакций в ответ на заражение клубеньковыми бактериями

или обработку Nod-факторами может быть связана с развитием инфекционного процесса при симбиозе. Ранее необходимость образования активных форм кислорода была показана для формирования инфекционных нитей. Кроме того, с активацией защитных реакций (в частности, реакции гиперчувствительности) может быть связана негативная регуляция числа формирующихся инфекционных нитей, что ограничивает избыточное развитие инфекции (Vasse et al., 1993).

В протеоме инокулированных корней гороха обнаружен белок каллуса P23, который является протеинкиназой, взаимодействующей с кальцинерин B-подобными белками (calcineurin B-like interacting protein kinases, CIPK) (см. таблицу и рис. 2). Этот белок относится к семейству трансляционно контролируемых опухолевых белков (translationally-controlled tumor-like protein TCTP), широко распространенных среди эукариот. Основная функция белков семейства TCTP направлена на регуляцию содержания кальция в цитоплазме (Graidist et al., 2007). У млекопитающих белки этого семейства вовлечены главным образом в регуляцию пролиферации клеток и апоптоза, что связано с контролем содержания кальция в клетках.

Известно, что в регуляцию реакций с участием кальция могут быть вовлечены кальций-связывающие кальмодулины и кальмодулин-подобные белки (присутствуют у всех эукариот) и специфичные для растений кальций-зависимые протеинкиназы (calcium dependent protein kinase, CDPK) (Sanders et al., 2002), а также кальцинерин B-подобные белки (от англ. calcineurin B-like protein, CBL) и взаимодействующие с ними протеинкиназы CIPK (Battaglia, Kudla, 2009). Такое разнообразие позволяет формировать сложную динамическую сигнальную сеть, тонко регулирующую ответные реакции растения на разнообразные внешние и внутренние стимулы с участием кальция. У растений белки данного семейства участвуют в контроле развития апоптоза, при этом они могут связывать кальций и взаимодействовать с другими белками цитоплазмы и мембран (Zhang et al., 2012; Hoepfänger et al., 2013). Помимо апоптоза, белки способны регулировать реакцию растений на абиотический стресс и развитие иммунного ответа, в которых важную роль играет кальций (Sanders et al., 2002). Какую роль играет этот сигнальный регулятор в развитии симбиоза, еще предстоит выяснить.

Таким образом, проведенный нами дифференциальный протеомный анализ корней гороха на ранних этапах развития симбиоза с *R. leguminosarum* bv. *viciae* RCAM 1026 позволил выявить ряд потенциальных регуляторов, детальное изучение роли которых в дальнейшем станет основой для понимания сложной системы сигнальной регуляции, активирующейся у растений гороха при взаимодействии с клубеньковыми бактериями.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Science Foundation, project 16-16-10043, with the use of the equipment of the Shared Access Center «Genomic technologies, proteomics, and cell biology», All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Ach R.A., Grussem W. A small nuclear GTP-binding protein from tomato suppresses a *Schizosaccharomyces pombe* cell-cycle mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994;91(13):5863-5867. DOI 10.1073/pnas.91.13.5863.
- Ane J.M., Kiss G.B., Riely B.K., Penmetsa R., Oldroyd G.E., Ayax C., Lévy J., Debellé F., Baek J.M., Kalo P., Rosenberg C., Roe B.A., Long S.R., Dénarié J., Cook D.R. *Medicago truncatula* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science*. 2004;303:1364-1367. DOI 10.1126/science.1092986.
- Batistic O., Kudla J. Plant calcineurin B-like proteins and their interacting protein kinases. *Bioch. Biophys. Acta*. 2009;1793(6):985-992. DOI 10.1016/j.bbamcr.2008.10.006.
- Battaglia M., Olvera-Carrillo Y., Garcarrubio A., Campos F., Covarrubias A.A. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol*. 2008;148:6-24. DOI 10.1104/pp.108.120725.
- Bestel-Corre G., Dumas-Gaudot E., Poinot V., Dieu M., Dierick J.F., van Tuinen D., Remacle J., Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. Proteome analysis and identification of symbiosis-related proteins from *Medicago truncatula* Gaertn. by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis*. 2002;23:122-137. DOI 10.1002/1522-2683(200201)23:1<122::aid-elps122>3.0.co;2-4.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 1976;72:248-254. DOI 10.1006/abio.1976.9999.
- Brewin N.J. Development of the legume root nodule. *Annu. Rev. Cell. Biol*. 1991;7:191-226. DOI 10.1146/annurev.cellbio.7.1.191.
- Bourgeois M., Jacquin F., Savoie V., Sommerer N., Labas V., Henry C., Burstin J. Dissecting the proteome of pea mature seeds reveals the phenotypic plasticity of seed protein composition. *Proteomics*. 2009;9:254-271. DOI 10.1002/pmic.200700903.
- Capoen W., Sun J., Wysham D., Otegui M.S., Venkateshwaran M., Hirsch S., Miwa H., Downie J.A., Morris R.J., Ané J.M., Oldroyd G.E. Nuclear membranes control symbiotic calcium signaling of legumes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011;108:14348-14353. DOI 10.1073/pnas.1107912108.
- Castillejo M.Á., Curto M., Fondevilla S., Rubiales D., Jorrín J. Two-dimensional electrophoresis based proteomic analysis of the pea (*Pisum sativum*) in response to *Mycosphaerella pinodes*. *J. Agric. Food Chem*. 2010;58:12822-12832. DOI 10.1021/jf1036917.
- Castillejo M.Á., Fernández-Aparicio M., Rubiales D. Proteomic analysis by two-dimensional differential in gel electrophoresis (2D DIGE) of the early response of *Pisum sativum* to *Orobanche crenata*. *Exp. Bot*. 2011;63:107-119. DOI 10.1093/jxb/err246.
- Chen J.G. Heterotrimeric G-protein signaling in *Arabidopsis*. Puzzling G-protein-coupled receptor. *Plant Signal Behav*. 2008;12:1042-1045. DOI 10.4161/psb.3.12.6064.
- Choudhury S.R., Bisht N.C., Thompson R., Todorov O., Pandey S. Conventional and novel Gγ protein families constitute the heterotrimeric G-protein signaling network in soybean. *PLoS ONE*. 2011;6(8):e23361. DOI 10.1371/journal.pone.0023361.
- Choudhury S.R., Pandey S. Phosphorylation-dependent regulation of G-protein cycle during nodule formation in soybean. *Plant Cell*. 2015;27(11):3260-3276. DOI 10.1105/tpc.15.00517.
- Colmenero-Flores J.M., Moreno L.P., Smith C., Covarrubias A.A. Pvlea-18, a member of a new late-embryogenesis-abundant protein family that accumulates during water stress and in the growing regions of well-irrigated bean seedlings. *Plant Physiol*. 1999;120:93-103. DOI 10.1104/pp.120.1.93.
- Dam S., Dyrland T.F., Ussatjuk A., Jochimsen B., Nielsen K., Goffard N., Ventosa M., Lorentzen A., Gupta V., Andersen S.U., Eng-hild J.J., Ronson C.W., Roepstorff P., Stougaard J. Proteome reference maps of the *Lotus japonicus* nodule and root. *Proteomics*. 2013;14:230-240. DOI 10.1002/pmic.201300353.
- Den Hartog M., Musgrave A., Munnik T. Nod factor-induced phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate formation: a role for phospholipase C and D in root hair deformation. *Plant J*. 2001;25:55-65. DOI 10.1111/j.1365-3113x.2001.00931.x.
- D'Haeze W., Holsters M. Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology*. 2002;12:79R-105R. DOI 10.1093/glycob/12.6.79r.
- Dumont E., Bahrman N., Goulas E., Valot B., Sellier H., Hilbert J.L., Vuylsteker C., Lejeune-Hénaut I., Delbreil B. A proteomic approach to decipher chilling response from cold acclimation in pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Sci*. 2011;80:86-98. DOI 10.1016/j.plantsci.2010.09.006.
- Endre G., Kereszt A., Kevei Z., Mihacea S., Kaló P., Kiss G.B. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature*. 2002;417:962-966. DOI 10.1038/nature00842.
- Gerke V., Moss S.E. Annexins: from structure to function. *Physiol. Rev*. 2002;82:331-371. DOI 10.1152/physrev.00030.2001.
- Graidist P., Yazawa M., Tonganunt M., Nakatomi A., Lin C.C., Chang J.Y., Phongdara A., Fujise K. Fortilin binds Ca²⁺ and blocks Ca²⁺-dependent apoptosis in vivo. *Biochem. J*. 2007;408:181-191. DOI 10.1042/BJ20070679.
- Groth M., Takeda N., Perry J., Uchida H., Dräxl S., Brachmann A., Sato S., Tabata S., Kawaguchi M., Wang T.L., Parniske M. NENA, a *Lotus japonicus* homolog of Sec13, is required for rhizodermal infection by arbuscular mycorrhiza fungi and rhizobia but dispensable for cortical endosymbiotic development. *Plant Cell*. 2010;22:2509-2526. DOI 10.1105/tpc.109.069807.
- Hoepfänger M.C., Reitsamer J., Geretschlaeger A.M., Mehler N., Tenhaken R. The effect of Translationally Controlled Tumour Protein (TCTP) on programmed cell death in plants. *Plant Biol*. 2013;13:1-10. DOI 10.1186/1471-2229-13-135.
- Kanamori N., Madsen L.H., Radutoiu S., Frantescu M., Quistgaard E.M., Miwa H., Downie J.A., James E.K., Felle H.H., Haaning L.L., Jensen T.H., Sato S., Nakamura Y., Tabata S., Sandal N., Stougaard J. A nucleoporin is required for induction of Ca²⁺ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006;103(2):359-364. DOI 10.1073/pnas.0508883103.
- Kirienko A.N., Leppyanen I.V., Gribchenko E.S., Dolgikh E.A. Features of protein isolation for pea *Pisum sativum* L. root proteome analysis during symbiosis with rhizobia. *Agrobiologia*. 2017;52(5):1012-1020. DOI 10.15389/agrobiologia.2017.5.1012rus.
- Kodavali P.K., Skowronek K., Koszela-Piotrowska I., Strzelecka-Kiliszek A., Pawlowski K., Pikula S. Structural and functional characterization of annexin 1 from *Medicago truncatula*. *Plant Physiol. Biochem*. 2013;73:56-62. DOI 10.1016/j.plaphy.2013.08.010.
- Lee Y., Kim M.H., Kim S.K., Kim S.H. Phytochrome-mediated differential gene expression of plant Ran/TC4 small G-proteins. *Planta*. 2008;228:215-224. DOI 10.1007/s00425-008-0745-x.
- Levy J., Bres C., Geurts R., Chalhoub B., Kulikova O., Duc G., Journet E.P., Ané J.M., Lauber E., Bisseling T., Dénarié J., Rosenberg C., Debellé F. A putative Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science*. 2004;303:1361-1363. DOI 10.1126/science.1093038.
- Madsen E.B., Madsen L.H., Radutoiu S., Olbryt M., Rakwalska M., Szczygłowski K., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Sandal N., Stougaard J. A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature*. 2003;425(6958):637-640. DOI 10.1038/nature02045.
- Malkov N., Fliegmann J., Rosenberg C., Gascioli V., Timmers A., Nurisso A., Cullimore J., Bono J.J. Molecular basis of lipo-chitooligosaccharide recognition by the lysin motif receptor-like kinase LYR3 in legumes. *Biochem. J*. 2016;473:1369-1378. DOI 10.1042/BJC20160073.
- Marsh J.F., Rakocevic A., Mitra R.M., Brocard L., Sun J., Eschstruth A., Long S.R., Schultze M., Ratet P., Oldroyd G.E. *Medicago truncatula* NIN is essential for rhizobial-independent nodule organogenesis induced by autoactive calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Plant Physiol*. 2007;144:324-335. DOI 10.1104/pp.106.093021.
- Marx H., Minogue C.E., Jayaraman D., Richards A.L., Kwiecien N.W., Siahipirani A.F., Rajasekar S., Maeda J., Garcia K., Del Valle-Echevarria A.R., Volkening J.D., Westphall M.S., Roy S., Sussman M.R.,

- Ané J.M., Coon J.J. A proteomic atlas of the legume *Medicago truncatula* and its nitrogen-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. Nat. Biotechnol. 2016;34:1198-1205. DOI 10.1038/nbt.3681.
- Mason M.G., Botella J.R. Completing the heterotrimer: isolation and characterization of an *Arabidopsis thaliana* G protein γ -subunit cDNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000;97:14784-14788. DOI 10.1073/pnas.97.26.14784.
- Morris A.C., Djordjevic M.A. Proteome analysis of cultivar-specific interactions between *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* and subterranean clover cultivar Woogenellup. Electrophoresis. 2001;22:586-598. DOI 10.1002/1522-2683(200102)22:3<586::AID-ELPS586>3.0.CO;2-L.
- Moss S.E., Morgan R.O. The annexins. Genome Biol. 2004;5(4):219. DOI 10.1186/gb-2004-5-4-219.
- Nakagawa T., Kaku H., Shimoda Y., Sugiyama A., Shimamura M., Takanashi K., Yazaki K., Aoki T., Shibuya N., Kouchi H. From defense to symbiosis: limited alterations in the kinase domain of LysM receptor-like kinases are crucial for evolution of legume-Rhizobium symbiosis. Plant J. 2011;65:169-180. DOI 10.1111/j.1365-3113X.2010.04411.x.
- Niebel F.C., Lescure N., Cullimore J., Gamas P. The *Medicago truncatula* MtAnn1 gene encoding an annexin is induced by Nod factors and during the symbiotic interaction with *Rhizobium meliloti*. Mol. Plant-Microbe Interac. 1998;11:504-513. DOI 10.1094/MPMI.1998.11.6.504.
- Oldroyd G.E., Downie J.A. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. Annu. Rev. Plant Biol. 2008;59:519-546. DOI 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839.
- Ovchinnikova E., Journet E.P., Chabaud M., Cosson V., Ratet P., Duc G., Fedorova E., Liu W., den Camp R.O., Zhukov V., Tikhonovich I., Borisov A., Bisseling T., Limpens E. IPD3 controls the formation of nitrogen-fixing symbiosomes in pea and *Medicago* spp. Mol. Plant-Microbe Interac. 2011;24:1333-1344. DOI 10.1094/MPMI-01-11-0013.
- Pollard H.B., Burns A.L., Rojas E. Synexin (annexin VII): a cytosolic calcium-binding protein which promotes membrane fusion and forms calcium channels in artificial bilayer and natural membranes. J. Membr. Biol. 1990;117:101-112. DOI 10.1007/bf01868677.
- Ramu S.K., Peng H.M., Cook D.R. Nod factor induction of reactive oxygen species production is correlated with expression of the early nodulin gene rip1 in *Medicago truncatula*. Mol. Plant-Microbe Interac. 2002;15:522-528. DOI 10.1094/MPMI.2002.15.6.522.
- Rivero C., Traubenik S., Zanetti M.E., Blanco F.A. Small GTPases in plant biotic interactions. Small GTPases. 2017;23:1-11. DOI 10.1080/21541248.2017.1333557.
- Saalbach G., Erik P., Wienkoop S. Characterisation by proteomics of peribacteroid space and peribacteroid membrane preparations from pea (*Pisum sativum*) symbiosomes. Proteomics. 2002;2:325-337. DOI 10.1002/1615-9861(200203)2:3<325::aid-prot325>3.0.co;2-w.
- Saito K., Yoshikawa M., Yano K., Miwa H., Uchida H., Asamizu E., Sato S., Tabata S., Imaizumi-Anraku H., Umehara Y., Kouchi H., Mu-rooka Y., Szczyglowski K., Downie J.A., Parniske M., Hayashi M., Kawaguchi M. NUCLEOPORIN85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbioses, and seed production in *Lotus japonicus*. Plant Cell. 2007;19:610-624. DOI 10.1105/tpc.106.046938.
- Sanders D., Pelloux J., Brownlee C., Harper J.F. Calcium at the crossroads of signaling. Plant Cell. 2002;14:S401-S417. DOI 10.1105/tpc.002899.
- Savoué A., Sallaud C., El-Turk J., Zuanazzi J., Ratet P., Schultze M., Kondorosi A., Esnault R., Kondorosi E. Distinct response of *Medicago* suspension cultures and roots to Nod factors and chitin oligomers in the elicitation of defense-related responses. Plant J. 1997;11:277-287. DOI 10.1046/j.1365-3113X.1997.11020277.x.
- Schenkluhn L., Hohnjec N., Niehaus K., Schmitz U., Colditz F. Differential gel electrophoresis (DIGE) to quantitatively monitor early symbiosis- and pathogenesis-induced changes of the *Medicago truncatula* root proteome. J. Proteomics. 2010;73:753-768. DOI 10.1016/j.jprot.2009.10.009.
- Schultze M., Kondorosi A. Regulation of symbiotic root nodule development. Annu. Rev. Genet. 1998;32:33-57. DOI 10.1146/annurev.genet.32.1.33.
- Smit P., Raedts J., Portyanko V., Debelle F., Gough C., Bisseling T., Geurts R. NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. Science. 2005;308:1789-1791. DOI 10.1126/science.1111025.
- Subramaniam G., Trusov Y., Lopez-Encina C., Hayashi S., Batley J., Botella J. R. Type B heterotrimeric G protein γ subunit regulates auxin and ABA signaling in tomato. Plant Physiol. 2016;170:1117-1134. DOI 10.1104/pp.15.01675.
- Sun J., Miller J.B., Granqvist E., Wiley-Kalil A., Gobbato E., Maillet F., Cottaz S., Samain E., Venkateshwaran M., Fort S., Morris R., Ané J.M., Dénarié J., Oldroyd G.E. Activation of symbiosis signaling by arbuscular mycorrhizal fungi in legumes and rice. Plant Cell. 2015;27:823-838. DOI 10.1105/tpc.114.131326.
- Tarchevsky I.A., Egorova A.M. Proteomic analysis of cycloheximide influence on pea roots. Fiziologiya rasteniy = Plant Physiology. 2015;62(6):883-895. (in Russian)
- Tarchevsky I.A., Yakovleva V.G., Egorova A.M. Proteomic analysis of salicylate-induced proteins of pea (*Pisum sativum* L.) leaves. Biochemistry (Moscow). 2010;75(5):590-597.
- Ullah H., Chen J.-G., Temple B., Boyes D.C., Alonso J.M., Davis K.R., Ecker J.R., Jones A.M. The β -subunit of the Arabidopsis G protein negatively regulates auxin-induced cell division and affects multiple developmental processes. Plant Cell. 2003;15:393-409. DOI 10.1105/tpc.006148.
- Valenta R., Ferreira F., Grote M., Swoboda I., Vrtala S., Duchêne M., Deviller P., Meagher R.B., McKinney E., Heberle-Bors E., Krafts D., Scheiner O. Identification of profilin as an actin binding protein in higher plants. J. Biol. Chem. 1993;268:22777-22781.
- Van Brussel A.A.N., Planqué K., Quispel A. The wall of *Rhizobium leguminosarum* in bacteroid and free-living forms. J. Gen. Microbiol. 1977;101:51-56. DOI 10.1099/00221287-101-1-51.
- Van Brussel A.A.N., Tak T., Wetselaar A., Pees E., Wijffelman C.A. Small *Leguminosae* as test plants for nodulation of *Rhizobium leguminosarum* and other rhizobia and agrobacteria harbouring a *leguminosarum* Sym plasmid. Plant Sci. Lett. 1982;27:317-325. DOI 10.1016/0304-4211(82)90134-1.
- Vasse J., Billy F., Truchet G. Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction. Plant J. 1993;4:555-566. DOI 10.1046/j.1365-3113X.1993.04030555.x.
- Vidal L., Pérez H.E., Valdés V., Noguez R., Zamudio F., Sánchez F. Purification, characterization, and cDNA cloning in profilin from *Phaseolus vulgaris*. Plant Physiol. 1995;108:115-123. DOI 10.1104/pp.108.1.115.
- Voss T., Haberl P. Observations on the reproducibility and matching efficiency of two-dimensional electrophoresis gels: Consequences for comprehensive data analysis. Electrophoresis. 2000;21(16):3345-3350. DOI 10.1002/1522-2683(20001001)21:16<3345::AID-LPS3345>3.0.CO.
- Zhang C., Srinivasan Y., Arlow D.H., Fung J.J., Palmer D., Zheng Y., Green H.F., Pandey A., Dror R.O., Shaw D.E., Weis W.L., Coughlin S.R., Kobilka B.K. High-resolution crystal structure of human protease-activated receptor 1. Nature. 2012;492:387-392. DOI 10.1038/nature11701.
- Zhukov V., Radutoiu S., Madsen L.H., Rychagova T., Ovchinnikova E., Borisov A., Tikhonovich I., Stougaard J. The pea *Sym37* receptor kinase gene controls infection-thread initiation and nodule development. Mol. Plant-Microbe Interac. 2008;21:1600-1608. DOI 10.1094/MPMI-21-12-1600.



Полиморфизм генов *CYP1A1* и *CYP2D6* в популяциях бурят, телеутов и у русских Восточной Сибири

А.Э. Табиханова¹✉, А.П. Осипова^{1, 2}, Т.В. Чуркина¹, Е.Н. Воронина^{2, 3}, М.Л. Филипенко^{2, 3}

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Изучение полиморфизма генов системы биотрансформации ксенобиотиков в популяциях человека – важное направление современных медико-генетических исследований. Цель настоящей работы – определение частот аллелей генов *CYP1A1* (A2455G (*2C), rs1048943), *CYP2D6* (A2549del (*3), rs35742686); G1846A (*4), rs3892097) в популяциях телеутов ($n = 115$), восточных ($n = 132$) и западных ($n = 280$) бурят, их метисов ($n = 56$), а также в выборке русских Восточной Сибири ($n = 122$). Генотипирование проводили с помощью ПЦР в режиме реального времени с использованием конкурирующих TaqMan-зондов. Частота варианта *CYP1A1**2C (A2455G) составила в выборке восточных бурят 28.8 %, западных бурят 34.6 %, телеутов 16.7 %, в выборке метисов бурят 31.3 %. В выборке русских Восточной Сибири частота аллеля *CYP1A1**2C (A2455G) равна 4.1 %, что соответствует данным по другим европеоидным популяциям. Повышенный, по сравнению с русскими, популяционный риск развития заболеваний, вызываемых техногенными загрязнителями: диоксинами и полициклическими ароматическими углеводородами – субстратами цитохрома *CYP1A1*, прогнозируется как у телеутов, так и у бурят. Полиморфный вариант *CYP2D6**3 (A2549del) не выявлен в трех выборках коренных сибирских популяций – бурят и телеутов; среди русских его встречаемость 0.4 %, в выборке метисов – 2.7 %. Частота аллеля *CYP2D6**4 (G1846A) у восточных и западных бурят составляет 5.3 и 4.3 % соответственно, у телеутов – 7.4 %, в выборке русских она статистически значимо выше, чем у бурят, – 12 %, у метисов – 9.8 %. Прогнозируются пониженные, по сравнению с русскими, риски побочных эффектов лекарственных препаратов, а также онкологических заболеваний, ассоциированных с аллелями *CYP2D6**3 (A2549del) и *CYP2D6**4 (G1846A), у коренных жителей Южной и Восточной Сибири – бурят и телеутов. Однако метисация привносит в коренные популяции новые полиморфные варианты, сдвигает генные частоты и ведет к изменению степени рисков.

Ключевые слова: буряты; телеуты; русские Восточной Сибири; метисы; ПЦР в режиме реального времени; полиморфизм генов биотрансформации ксенобиотиков; *CYP1A1* (A2455G (*2C), rs1048943); *CYP2D6* (A2549del (*3), rs35742686); *CYP2D6* (G1846A (*4), rs3892097).

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Табиханова А.Э., Осипова А.П., Чуркина Т.В., Воронина Е.Н., Филипенко М.Л. Полиморфизм генов *CYP1A1* и *CYP2D6* в популяциях бурят, телеутов и у русских Восточной Сибири. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(2):205-211. DOI 10.18699/VJ18.348

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Tabikhanova L.E., Osipova L.P., Churkina T.V., Voronina E.N., Filipenko M.L. Genetic polymorphism of *CYP1A1* and *CYP2D6* in populations of Buryats, Teleuts and Russians of Eastern Siberia. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(2):205-211. DOI 10.18699/VJ18.348 (in Russian)

Received 10.09.2017
Accepted for publication 30.10.2017
© AUTHORS, 2018

✉ e-mail: tabikhan@bionet.nsc.ru

Genetic polymorphism of *CYP1A1* and *CYP2D6* in populations of Buryats, Teleuts and Russians of Eastern Siberia

L.E. Tabikhanova¹✉, L.P. Osipova^{1, 2}, T.V. Churkina¹, E.N. Voronina^{2, 3}, M.L. Filipenko^{2, 3}

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

The study of the gene polymorphism of the system of biotransformation of xenobiotics is an important area of modern medical and genetic research. The aim of this work is to study the frequency of the alleles of the *CYP1A1* (A2455G (*2C), rs1048943), *CYP2D6* (A2549del (*3), rs35742686); G1846A (*4), rs3892097) genes of Teleuts ($n = 115$), Eastern Buryats ($n = 132$), Western Buryats ($n = 280$), their Métis ($n = 56$), and Russians of East Siberia ($n = 122$). Genotyping was performed using real-time PCR with competitive TaqMan allele-specific probes. The frequency of the *CYP1A1**2C (A2455G) allele was 28.8 % in the Eastern Buryat, 34.6 % in the Western Buryat, 16.7 % in the Teleut, and 31.3 % in the Métis cohort. The frequency of *CYP1A1**2C (A2455G) in the Russians of Eastern Siberia (4.1 %) corresponds to the frequency range found in European populations. A high-frequency occurrence of *CYP1A1**2C (A2455G) among Buryats and Teleuts may be indicative of a higher population-wide risk of diseases influenced by technogenic pollutants – substrates of *CYP1A1*. The *CYP2D6**3 (A2549del) allele was not detected in cohorts of indigenous populations, among Russians it was 0.4 %, and it was 2.7 % among Métis. The frequency of *CYP2D6**4 (G1846A) in Eastern and Western Buryats was 5.3 % and 4.3 %, respectively, for Teleuts it was 7.4 %. It was significantly higher in the Russian population (12 %), and among Métis (9.8 %). The obtained data makes it possible to predict a reduced risk of side effects of drugs and cancer associated with *CYP2D6**3 (A2549del) and *CYP2D6**4 (G1846A) in the Buryat and Teleut populations. However, metisation introduces new polymorphic variants into indigenous populations, shifts gene frequencies and changes the degree of risks.

Key words: Buryats; Teleuts; Russians of Eastern Siberia; Métis; real-time PCR; polymorphism of genes for xenobiotic biotransformation; *CYP1A1* (A2455G (*2C), rs1048943); *CYP2D6* (A2549del (*3), rs35742686); *CYP2D6* (G1846A (*4), rs3892097).

Современные методы молекулярно-генетического и эпидемиологического анализа структуры ДНК позволяют оценить в динамике состояние структурной вариабельности значительного числа генов в генофондах отдельных популяций. В связи с этим дальнейшие направления исследований должны включать изучение географических и исторических данных, а также обследование относительно изолированных групп, находящихся в течение продолжительного времени под постоянным давлением какого-либо неблагоприятного фактора среды. Для решения этих задач выполнена работа по исследованию генов системы биотрансформации ксенобиотиков *CYP1A1* и *CYP2D6* в популяциях бурят, телеутов и русских Восточной Сибири.

Функция системы биотрансформации ксенобиотиков заключается, с одной стороны, в обезвреживании широкого спектра чужеродных химических соединений, поступающих в организм вследствие загрязнения окружающей среды в виде лекарств, при курении и т. п. С другой стороны, она защищает организм от активных метаболитов, поддерживает окислительно-восстановительный баланс в клетках, тканях и органах. Метаболизм ксенобиотиков – сложный многоуровневый процесс, включающий три фазы: активация (I), детоксикация (II) и выведение (III). Фаза I – начальный процесс в преобразовании ксенобиотиков, от активности которой зависит их дальнейшее превращение в безопасные продукты выведения. Среди генов фазы I значимое место занимает суперсемейство цитохромов P-450 (CYP), расположенное на 15-й хромосоме. Цитохром *CYP1A1* метаболизирует диоксины и полициклические ароматические углеводороды, которые являются основными техногенными загрязнителями окружающей среды (Zhang et al., 2006), цитохром *CYP2D6* представляет интерес для исследователей, так как участвует в метаболизме 20–25 % лекарственных средств, в частности противоопухолевых препаратов, антидепрессантов, нейролептиков, бета-блокаторов, антиаритмических препаратов (Zhоu, 2009). Важная роль в активности системы биотрансформации отводится индивидуальным особенностям генома человека.

Цель настоящей работы – изучение частот аллелей генов фазы I системы биотрансформации ксенобиотиков *CYP1A1* (*A2455G* (*2C), *rs1048943*); *CYP2D6* (*A2549del* (*3), *rs35742686*); *G1846A* (*4), *rs3892097*) в популяциях телеутов, бурят (восточных и западных) и их метисов, а также в выборке русских Восточной Сибири.

Материалы и методы

Образцы биоматериала собраны в ходе экспедиционных работ в 2003–2005 гг. сотрудниками лаборатории популяционной этногенетики Института цитологии и генетики СО РАН. Для проведения исследования составлено пять выборок населения Южной и Восточной Сибири. Выборка восточных бурят сформирована в поселках Алханай и Орловский Агинского Бурятского округа Забайкальского края ($n = 132$) (Tabikhanova, Osipova, 2012). Этнические буряты, проживающие в Усть-Ордынском Бурятском округе Иркутской области в поселках Корсук, Кулункун, Олой, Харат, Ользоны и Усть-Ордынский вошли в выборку западных бурят ($n = 280$). Потомки первого и второго по-

колений от смешанных браков бурят, в основном западных (84 %), с русскими составили выборку метисов ($n = 56$). В исследование также включены телеуты Беловского района Кемеровской области ($n = 115$). Русские старожилы, несколько поколений предков которых проживало вместе с бурятами в селах Забайкальского края и Иркутской области, составили пятую выборку ($n = 122$). Забор крови производили у добровольцев, практически здоровых во время исследования, по международным правилам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), с использованием «Информированного согласия» обследуемых.

Буряты – один из самых многочисленных народов Восточной Сибири (более 460 тыс. человек, по данным переписи 2010 г.). Бурятский язык относится к монгольской языковой группе; его представители антропологически характеризуются ярко выраженными монголоидными особенностями, без европеоидного компонента (Золотарева, 1960). Исследования генофонда бурят выявили его большую дифференцированность в соответствии с географической локализацией (Бабушкина и др., 2014; Харьков и др., 2014), что может быть отражением сложного этногенеза бурят и неоднородности бурятских племен на территориях проживания. Предками бурят, живущих в Агинском Бурятском округе Забайкальского края, считаются хоринцы – одно из монгольязычных племен, которое застали русские в середине 17-го века (Долгих, 1953). Монгольязычные племена эхиритов и булагатов в 17-м веке приняли участие в формировании бурят Баяндаевского и Эхирит-Булагатского районов Усть-Ордынского Бурятского округа Иркутской области.

Телеуты – коренная малочисленная народность (около 2,5 тыс. человек) Южной Сибири, им принадлежит исключительная роль в формировании всех групп алтайцев, как северных, так и южных (Потапов, 1969). Телеутский язык, согласно классификации тюркских языков, рассматривается в качестве самостоятельного языка или выделяется как один из южных диалектов алтайского. Сравнительный анализ генофонда телеутов, по данным маркеров Y-хромосомы, показал, что телеутский этнос сформировался на основе древнетюркских и самодийских этнических компонентов (Kharkov et al., 2009). Исследования современной генетико-демографической структуры фиксируют угрожающие тенденции депопуляции телеутского этноса (Лавряшина и др., 2013).

Образцы ДНК были выделены из лейкоцитарных фракций венозной крови с помощью наборов «Биосилика» (Россия). Генотипирование однонуклеотидных замен в генах *CYP1A1* (*A2455G* (*2C), *rs1048943*), *CYP2D6* (*G1846A* (*4), *rs3892097*) и делеции одного нуклеотида в гене *CYP2D6* (*A2549del* (*3), *rs35742686*) выполняли в режиме реального времени с использованием конкурирующих TaqMan-зондов, комплементарных полиморфным участкам ДНК (Корчагина и др., 2011; Tiis et al., 2016). Оценку соответствия частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга проводили с использованием критерия χ^2 (Пирсона) (при $p > 0.05$ равновесие выполняется). Достоверность различий в частотах аллелей между исследованными выборками вычисляли по критерию χ^2 с применением поправки Йейтса на непрерывность (при $p < 0.05$ результаты считались статистически значимыми).

Результаты

Генотипы полиморфных локусов *CYP1A1* (*A2455G* (*2C), *rs1048943*), *CYP2D6* (*A2549del* (*3), *rs35742686*), *CYP2D6* (*G1846A* (*4), *rs3892097*) определены в выборках бурят (восточных и западных), телеутов, русских Восточной Сибири, а также среди потомков смешанных браков бурят с русскими. Распределение частот генотипов соответствует равновесию Харди–Вайнберга во всех группах (табл. 1).

Частоты аллелей *CYP1A1**2C (*2455G*), *CYP2D6**3 (*2549del*) и *CYP2D6**4 (*1846A*) в пяти изученных выборках населения Южной и Восточной Сибири и достоверность различий между ними в сравнении с литературными данными для некоторых популяций человека представлены в табл. 2–4.

Показано, что частота аллеля *CYP1A1**2C (*2455G*) в выборках восточных и западных бурят равна 28.8 и 34.6 %, соответственно.

Table 1. Distribution of genotypes for *CYP1A1* (*A2455G* (*2C), *rs1048943*), *CYP2D6* (*A2549del* (*3), *rs35742686*) and *CYP2D6* (*G1846A* (*4), *rs3892097*) in groups of Buryats, their half-castes, Teleuts, and Russians of East Siberia

Groups		Eastern Buryats	Western Buryats	Buryat–Russian half-castes	Teleuts	Russians of East Siberia
<i>CYP1A1</i> (<i>A2455G</i>)	<i>n</i> , people	132	279	56	114	121
	Distribution of genotypes	<i>A/A</i>	122	27	78	113
		<i>A/G</i>	121	23	34	6
		<i>G/G</i>	36	6	2	2
	Compliance with the Hardy–Weinberg equilibrium, <i>p</i>	0.652	0.488	0.741	0.812	0.550
<i>CYP2D6</i> (<i>A2549del</i>)	<i>n</i> , people	132	279	56	114	122
	Distribution of genotypes	<i>A/A</i>	279	53	114	121
		<i>A/del</i>	0	3	0	1
		<i>del/del</i>	0	0	0	0
	Compliance with the Hardy–Weinberg equilibrium, <i>p</i>	<i>p</i> *	<i>p</i> *	0.981	<i>p</i> *	0.998
<i>CYP2D6</i> (<i>G1846A</i>)	<i>n</i> , people	131	280	56	115	121
	Distribution of genotypes	<i>G/G</i>	256	45	98	92
		<i>A/G</i>	24	11	17	29
		<i>A/A</i>	0	0	0	0
	Compliance with the Hardy–Weinberg equilibrium, <i>p</i>	0.915	0.912	0.853	0.867	0.705

*p** It is impossible to calculate the compliance with Hardy–Weinberg equilibrium, because of the absence of polymorphism for this locus in the group.

Table 2. Frequencies of allele *CYP1A1**2C (*2455G*) in groups of Buryats, their half-castes, Teleuts, Russians of East Siberia, and some ethnic groups of the world and comparison of populations (*p*-value)

Population/ethnic group	<i>n</i> , people	Percentage 2455G	Comparison of populations (<i>p</i> -value)				
			Eastern Buryats	Western Buryats	Buryat–Russian half-castes	Teleuts	Russians of East Siberia
Eastern Buryats*	132	28.8		0.115	0.717	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.001
Western Buryats*	279	34.6	0.115		0.573	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001
Half-castes*	56	31.3	0.717	0.573		<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.001
Teleuts*	114	16.7	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.05		<i>p</i> < 0.001
Russians of East Siberia*	121	4.1	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	
Caucasians in general (EUR**, The 1000 Genomes..., 2012)	503	3.5	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	0.797
East Asians in general (EAS**, The 1000 Genomes..., 2012)	504	25.2	0.267	<i>p</i> < 0.001	0.199	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.001
Northern Altaians (Soloepkin, Lavryashina, 2016)	202	24.2	0.217	<i>p</i> < 0.001	0.162	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.001
Khakas (Soloepkin, Lavryashina, 2016)	204	35.3	0.095	0.875	0.498	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001
South Altaians (Soloepkin, Lavryashina, 2016)	187	41.4	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05	0.07	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001

* Our data. ** Three-letter population code.

Table 3. Frequencies of allele *CYP2D6*3* (2549del) in groups of Buryats, their half-castes, Teleuts, Russians of East Siberia, and some ethnic groups of the world and comparison of the populations (*p*-value)

Population/ethnic group	<i>n</i> , people	Percentage of allele 2549del (*3)	Comparison of populations (<i>p</i> -value)				
			Eastern Buryats	Western Buryats	Buryat–Russian half-castes	Teleuts	Russians of East Siberia
Eastern Buryats*	132	0		<i>p</i> *	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> *	0.988
Western Buryats*	279	0	<i>p</i> *		<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> *	0.693
Half-castes*	56	2.7	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05		0.061	0.171
Teleuts*	114	0	<i>p</i> *	<i>p</i> *	0.060		0.954
Russians of East Siberia*	122	0.4	0.988	0.693	0.171	0.955	
East Asians in general (EAS, The 1000 Genomes..., 2012)	504	0	<i>p</i> *	<i>p</i> *	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> *	0.465
Caucasians in general (EUR, The 1000 Genomes..., 2012)	487	1.9	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05	0.828	0.072	0.166

* Our data. *p** It is impossible to calculate the compliance with Hardy–Weinberg equilibrium, because of the absence of polymorphism for this locus in groups to be compared.

Table 4. Frequencies of allele *CYP2D6*4* (1846A) in groups of Buryats, their half-castes, Teleuts, Russians of East Siberia, and some ethnic groups of the world and comparison of the populations (*p*-value)

Population/ethnic group	<i>n</i> , people	Percentage of allele 1846A (*4)	Comparison of populations (<i>p</i> -value)				
			Eastern Buryats	Western Buryats	Buryat–Russian half-castes	Teleuts	Russians of East Siberia
Eastern Buryats*	131	5.3		0.647	0.170	0.440	<i>p</i> < 0.05
Western Buryats*	280	4.3	0.647		<i>p</i> < 0.05	0.108	<i>p</i> < 0.001
Half-castes*	56	9.8	0.170	<i>p</i> < 0.05		0.583	0.668
Teleuts*	114	7.4	0.442	0.109	0.584		0.126
Russians of East Siberia*	122	12.0	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.001	0.668	0.126	
East Asians in general (EAS, The 1000 Genomes..., 2012)	504	0.2	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001
Russians of Moscow region (Ryzhikova et al., 2017)	290	18.1	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.05
Caucasians in general (EUR, The 1000 Genomes..., 2012)	487	18.6	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.05

* Our data.

у телеутов и русских Восточной Сибири статистически значимо ниже: 16.7 и 4.1 %. Различия по частоте аллеля между телеутами и русскими также статистически значимы. В выборке метисов бурят частота варианта *CYP1A1*2C* (2455G) составила 31.3 %, она, как можно было ожидать, является промежуточной по сравнению с западными бурятами и русскими Восточной Сибири.

Полиморфный вариант *CYP2D6*3* (2549del) не выявлен в трех выборках коренных сибирских популяций – бурят и телеутов. В выборке русских найден один человек – носитель этого аллеля, среди метисов их встретилось три, частота аллеля в этих выборках равна 0.4 и 2.7 % соответственно.

Частоты аллеля *CYP2D6*4* (1846A) сходны у восточных и западных бурят: 5.3 и 4.3 % соответственно, у телеутов несколько выше – 7.4 %; эти различия статистически не значимы. Частота варианта *CYP2D6*4* (1846A) в выборке русских выше – 12 %, различие между нею и выборками бурят достоверно. Аллель *CYP2D6*4* (1846A) у метисов найден с промежуточной частотой – 9.8 %.

Обсуждение

***CYP1A1*2C* (2455G).** Полиморфный вариант гена *CYP1A1*2C* (2455G, rs1048943) обуславливает продукцию фермента с высокой каталитической активностью, которая приводит к накоплению активных интермедиатов. Это резко увеличивает возможность мутационных изменений ДНК и химически индуцируемого канцерогенеза (Vineis et al., 2003). Таким образом, полиморфный вариант *CYP1A1*2C* (2455G) рассматривается как повышающий риск развития ряда мультифакториальных заболеваний (Русинова и др., 2013; Tiis et al., 2016). Исследования по распространенности варианта *CYP1A1*2C* (2455G) проведены во множестве мировых популяций. Нулевая частота аллеля *CYP1A1*2C* (2455G) зарегистрирована в некоторых африканских популяциях. В европеоидных выборках встречаемость его варьирует в пределах 2–6 % (Korytina et al., 2012; The 1000 Genomes..., 2012; Tiis et al., 2016), несколько выше – в популяциях Южной Азии: 10–14 %, среди населения Восточной Азии этот полиморфный вариант широко распространен: от 19 % у японцев, до

33 % у южных китайцев (Nakachi et al., 1993; Chen et al., 2011; The 1000 Genomes..., 2012). Максимальные значения частоты варианта *CYP1A1*2C* (2455G) зафиксированы в популяциях Южной Америки: до 70.6 % в Перу (The 1000 Genomes..., 2012). Таким образом, прослеживается прямо пропорциональный рост частоты этого полиморфного варианта в зависимости от расстояния до общепринятого места происхождения человека в Африке, вплоть до максимально удаленных от него точек расселения *Homo sapiens*. Возможно, носители аллеля *CYP1A1*2C* (2455G) имели некоторое селективное преимущество, способствующее накоплению этого варианта в популяциях человека. В России, помимо русских популяций, встречаемость аллеля *CYP1A1*2C* (2455G) изучена у татар и башкир Башкортостана: 6.4 и 10.5 % соответственно (Korytina et al., 2012); некоторых самодийских популяций: 23.8 % у тундровых ненцев и 39 % у нганасан (Tiis et al., 2016); популяций Южной Сибири – северных алтайцев (24.2 %), хакасов (35.3 %) и южных алтайцев (41.4 %) (Солопёкин, Лавряшина, 2016). Литературных данных о распространенности варианта *CYP1A1*2C* (2455G) среди бурят и телеутов не найдено.

В нашем исследовании показано, что частоты аллеля *CYP1A1*2C* (2455G) в выборках бурят лежат в интервале, характерном для других азиатских популяций. Не обнаружено статистически значимых различий между выборкой восточных бурят и суммарной выборкой восточных азиатов, куда вошли китайцы, корейцы и японцы, изученной в проекте «1000 Genomes» (см. табл. 2). По частоте аллеля *CYP1A1*2C* (2455G) обе выборки бурят статистически значимо отличаются от выборки европеоидов из проекта «1000 Genomes». Выборка телеутов статистически значимо отличается как от европеоидной, так и от монголоидной выборки. Несмотря на языковую, культурную и этническую близость телеутов и южных алтайцев, их различия по частоте аллеля *CYP1A1*2C* (2455G) статистически значимы, так же как и различия с двумя другими популяциями Южной Сибири – хакасами и северными алтайцами. Этот факт требует дальнейшей проверки. Частота аллеля *CYP1A1*2C* (2455G) в выборке русских Восточной Сибири в целом соответствует литературным данным по встречаемости этого варианта в европеоидных популяциях. Отличие ее от монголоидной выборки из проекта «1000 Genomes» статистически значимо.

Таким образом, в настоящей работе впервые изучен полиморфизм гена фазы I системы биотрансформации ксенобиотиков *CYP1A1* (A2455G, rs1048943) в этнических выборках бурят, телеутов и русских Восточной Сибири, а также в выборке потомков от смешанных браков бурят с русскими. В популяциях бурят и телеутов аллель *CYP1A1*2C* (2455G), ответственный за синтез фермента с повышенной активностью, ведущей к накоплению реактивных интермедиатов, встречается с частотой, превышающей значения для русских Восточной Сибири и других европеоидных популяций. В связи этим у коренного населения Южной и Восточной Сибири можно прогнозировать повышенный популяционный риск развития заболеваний, вызываемых органическими загрязнителями – субстратами цитохрома *CYP1A1*. Продemonстрировано некоторое понижение частоты изучаемого аллеля в

выборке потомков от смешанных браков бурят с русскими, что позволяет расценивать метисацию как позитивный фактор, уменьшающий этот риск.

***CYP2D6*3* (2549del) и *CYP2D6*4* (1846A).** Аллели *CYP2D6*3* (2549del) и *CYP2D6*4* (1846A) клинически значимы, поскольку они ответственны за синтез функционально неактивного фермента. У носителей этих аллелей существенно замедлен метаболизм некоторых экотоксикантов (в частности, лекарств), что делает неэффективным лечение или приводит к накоплению чужеродных веществ в организме и появлению серьезных побочных реакций (Zhou, 2009; Сычев, Андреевна, 2016). Медленные по цитохрому *CYP2D6* метаболизаторы подвержены повышенному риску развития онкологических заболеваний (Silveira et al., 2010; Eichelbaum, 2013).

Полиморфный вариант *CYP2D6*3* (2549del) отсутствует в популяциях Африки, Южной и Восточной Азии, с низкой частотой встречается в некоторых популяциях Южной Америки, его максимальная частота зафиксирована у европейцев: до 3.5 % в выборках финнов и англичан (The 1000 Genomes..., 2012). Вероятно, этот аллель имеет позднее эволюционное, предположительно, европейское происхождение. Вариант не найден в популяциях тундровых и лесных ненцев Северной Сибири, он присутствует с крайне низкой частотой и в других самодийских популяциях – нганасан (0.3 %) и селькупов (0.5 %) (Корчагина и др., 2011). С невысокой частотой он найден в русских популяциях: 0.9–1.7 % (Gra et al., 2010; Корчагина и др., 2011). Другие российские популяции к настоящему времени еще не изучены.

В нашем исследовании в выборках бурят и телеутов не выявлен аллель *CYP2D6*3* (2549del), что согласуется с его отсутствием или крайне низкими частотами среди других монголоидных популяций. Отличия выборки русских Восточной Сибири от выборок как европеоидов, так и монголоидов, исследованных в проекте «1000 Genomes», не являются статистически значимыми (см. табл. 3). Неожиданно высокую частоту аллеля *CYP2D6*3* (2549del) среди метисов бурят можно объяснить особенностями выборки.

Встречаемость аллеля *CYP2D6*4* (1846A) в различных по происхождению популяциях человека варьирует. В африканских популяциях она находится в пределах 3–12 %, в популяциях Южной Азии 8–12 %, Америки 6–16 %. Среди европеоидов зарегистрированы максимальные частоты этого аллеля: 14–23 %, в то время как в монголоидных популяциях Восточной Азии (среди китайцев, японцев и корейцев) его частота близка к нулю. В литературе встречается довольно много информации по российским популяциям. В выборках русских частота аллеля *CYP2D6*4* (1846A) варьирует в интервале, характерном для европеоидных популяций: 15–18 % (Казаков и др., 2008; Gra et al., 2010; Корчагина и др., 2011; Mustafina et al., 2015; Рыжикова и др., 2017), близки ему и частоты, полученные по некоторым популяциям Северного Кавказа: 13–21 % (Ромодановский и др., 2010; Рыжикова и др., 2017). Среди тюркских народов России (татары, башкиры) и у казахов этот аллель встречается реже: 4.5–9.2 % (Исакова и др., 2006; Mustafina et al., 2015), частота его среди самодийцев Северной Сибири составляет 3.3–7.3 % (Корчагина и

др., 2011), в различных по этническому происхождению популяциях Дальнего Востока – нанайцев, эвенков и чукчей – 1.4, 6.0 и 7.0 % соответственно (Казаков и др., 2008; Шуев и др., 2016). Данных о встречаемости этого аллеля в популяциях Южной и Восточной Сибири не найдено.

Полученные частоты аллеля *CYP2D6**4 (1846A) для выборки бурят и телеутов соответствуют интервалу, описанному у других популяций России, в генофонде которых есть монголоидный компонент, – тюркских, самодийских, тунгусских. Статистически значимы различия исследованных популяций бурят и телеутов с выборками европеоидов, описанными в литературе, и с суммарной выборкой Восточной Азии – японцами, китайцами и корейцами, в которой частота аллеля близка к нулю (см. табл. 4). Частота варианта *CYP2D6**4 (1846A) в нашей выборке русских несколько меньше, чем в других европеоидных выборках, что, возможно, является отражением контактов русского населения Восточной Сибири с соседями бурятами. Статистически значимы различия нашей выборки с русскими Московского региона, а также с собирательной выборкой европеоидов из проекта «1000 Genomes».

Таким образом, в популяциях коренного населения Южной и Восточной Сибири – бурятов и телеутов – впервые продемонстрированы отсутствие *CYP2D6**3 (2549del) и пониженная по сравнению с русскими встречаемость *CYP2D6**4 (1846A) – аллелей, ответственных за формирование фенотипа «медленный метаболизатор» лекарственных веществ. Представители этих этнических групп имеют меньшую предрасположенность к развитию побочных эффектов при лечении лекарственными препаратами и невысокий риск онкологических заболеваний, ассоциированных с изученными вариантами гена *CYP2D6*. Однако усиливающаяся метисация привносит в популяции новые генные варианты и способствует повышению этого риска. В выборке русских Восточной Сибири встречаемость «дефектных» аллелей *CYP2D6* ниже, чем у русских европейской части России, что может быть также учтено при проведении фармакотерапии.

Acknowledgments

This study was supported by the Russian Academy of Sciences, project II.2P/VI.58-4 (0324-2016-0029). The authors are grateful to Cand. Sci. (Biol.) T.M. Karafet, Cand. Sci. (Biol.) D.V. Lichman, Cand. Sci. (Med.) M.V. Legan, N.A. Moletotova, N.A. Vavilova, N.A. Burlakova, and A.O. Likhacheva for assistance in expeditions and laboratory studies.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Babushkina N.P., Eremina E.R., Kucher A.N., Genetic subdivision of the Buryat population. *Genetika = Genetics* (Moscow). 2014;50(3):330-340. DOI 10.7868/S0016675814020027. (in Russian)
- Chen J., Cheng M., Li Y., Jiang C. Relationship between *CYP1A1* genetic polymorphisms and renal cancer in China. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2011;12(9):2163-2166. DOI 10.3724/SPJ.1008.2008.00971.
- Dolgikh B.O. On the history of education of the Buryat people. *Sovetskaya etnografiya = Soviet Ethnography*. 1953;1:38-63. (in Russian)
- Eichelbaum M. Pharmacogenetics: current state after 30 years of research. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 2013;138(13):659-661. DOI 10.1055/s-0032-1332927.
- Gra O., Mityaeva O., Berdichevets I., Kozhekbaeva Z., Fesenko D., Kurbatova O., Goldenkova-Pavlova I., Nasedkina T. Microarray-based detection of *CYP1A1*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *GSTT1*, *GSTM1*, *MTHFR*, *MTRR*, *NQO1*, *NAT2*, *HLA-DQA1*, and *ABO* allele frequencies in native Russians. *Genet. Test Mol. Biomark.* 2010;14(3):329-342. DOI 10.1089/gtmb.2009.0158.
- Isakova J.O., Kazakov R.E., Ignatiev I.V., Sychev D.A. The frequencies of allelic variants of the clinically significant polymorphic marker G1846A in the *CYP2D6* gene in a group of ethnic Kazakhs. *Biomeditsina = Biomedicine*. 2006;1(2):28-29. (in Russian)
- Kazakov R.E., Ignatiev I.V., Koman I.E., Sychev D.A., Kukes V.G. Comparison of occurrences of the alleles and genotypes of polymorphous marker *G1846A* of gene *CYP2D6* in three ethnic groups of Chukotka. *Biomeditsina = Biomedicine*. 2008;1(2):40-44. (in Russian)
- Kharkov V.N., Khamina K.V., Medvedeva O.F., Simonova K.V., Eremina E.R., Stepanov V.A. Gene pool of Buryats: Clinal variability and territorial subdivision based on data of Y-chromosome markers. *Genetika = Genetics* (Moscow). 2014;50(2):203-213. DOI 10.7868/S0016675813110088. (in Russian)
- Kharkov V.N., Medvedeva O.F., Puzyrev V.P., Stepanov V.A., Luzina F.A., Gafarov N.I., Kolbasko A.V. Comparative characteristics of the gene pool of teleuts inferred from Y-chromosomal marker data. *Russ. J. Genet.* 2009;45(8):994-1003. DOI 10.1134/S1022795409080158.
- Korchagina R.P., Osipova L.P., Vavilova N.A., Ermolenko N.A., Voronina E.N., Filipenko M.L. Polymorphism of genes for xenobiotic biotransformation, *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2D6*, candidate markers of cancer risk, in indigenous peoples and Russians in Northern Siberia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2011;15(3):448-461. (in Russian)
- Korytina G., Kochetova O., Akhmadishina L., Viktorova E., Viktorova T. Polymorphisms of cytochrome p450 genes in three ethnic groups from Russia. *Balkan Med. J.* 2012;29(3):252-260. DOI 10.5152/balkanmedj.2012.039.
- Lavryashina M.B., Ulianova M.V., Tolochko T.A., Solopekin N.V., Padyukova A.D., Druzhinin V.G. Indigenous peoples of the Kemerovo oblast: specific dynamics of demographic processes in populations of Teleuts and Shors (1940–2012). *Vestnik Kemerovskogo gosudarstvennogo universiteta = Bulletin of Kemerovo State University*. 2013;2(3(55)):13-20. (in Russian)
- Mustafina O.E., Tuktarova I.A., Karimov D.D., Somova R.S., Nasibullin T.R. *CYP2D6*, *CYP3A5*, and *CYP3A4* gene polymorphisms in Russian, Tatar and Bashkir populations. *Russ. J. Genet.* 2015;51(1):98-107. DOI 10.1134/S1022795415010081.
- Nakachi K., Imai K., Hayashi S., Kawajiri K. Polymorphisms of the *CYP1A1* and glutathione S-transferase genes associated with susceptibility to lung cancer in relation to cigarette dose in a Japanese population. *Cancer Res.* 1993;53(13):2994-2999. DOI 10.1016/0169-5002(94)90751-X.
- Potapov L.P. *Etnicheskiy sostav i proiskhozhdenie altaytsev* [The ethnic composition and origin of Altaians]. Leningrad: Nauka Publ., 1969. (in Russian)
- Romodanovskiy D.P., Khapayev B.A., Ignatyev I.V., Kukes V.G., Karkishchenko V.N. The frequency of the “slow” allelic variants of the genes encoding cytochrome P450 isoenzymes *CYP2D6*, *CYP2C19*, and *CYP2C9* in Karachays and Circassians. *Biomeditsina = Biomedicine*. 2010;1(2):33-37. (in Russian)
- Rusinova G.G., Azizova T.V., Viazovskaya N.S., Gur'yanov M.Iu., Osovs S.V., Glazkova I.V. Role of ancestral genotypes of genes for cytochrome P450 *CYP1A1* and epoxy hydrolases in susceptibility to lung cancer among Mayak workers. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya = Radiological Biology. Radioecology*. 2013;53(4):344-354. DOI 10.7868/S0869803113030107. (in Russian)

- Ryzhikova K.A., Mirzayev K.B., Mammaiev S.N., Gafurov D.M., Kazakov R.E., Shuev G.N., Grishina E.A., Sozaeva Zh.A., Sychev D.A. The prevalence of polymorphisms of cytochrome P-450 genes and transporter protein genes in the Russian population and in three ethnic groups of the Republic of Dagestan. *Kremlevskaya meditsina. Klinicheskiy vestnik* = *Kremlin Medicine Journal*. 2017;1:32-38. (in Russian)
- Silveira V.S., Canalle R., Scrideli C.A., Queiroz R.G., Tone L.G. Role of the CYP2D6, EPHX1, MPO, and NQO1 genes in the susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in Brazilian children. *Environ. Mol. Mutagen*. 2010;51(1):48-56. DOI 10.1002/em.20510.
- Solopekin N.V., Lavryashina M.B. The study of polymorphism of the genes of xenobiotic biotransformation CYP1A1 (ILE462VAL), PON1 (GLN192ARG) in the populations of Altaians and Khakas people. *Materialy 51-oy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem "Fundamentalnye i prikladnye issledovaniya po problemam gigieny, meditsiny truda, ekologii cheloveka"* [Proc. of the 51 Intern. Conf. "Fundamental and applied research in hygiene, occupational medicine, and human ecology"]. Novokuznetsk, 2016;136-139. (in Russian)
- Sychev D.A., Andreyanova M.A. Fifteen-year experience in conducting pharmacogenetic studies: results and prospects. *Patogenez* = *Pathogenesis*. 2016;14(4):15-21. (in Russian)
- Shuev G.N., Sychev D.A., Suleymanov S.Sh., Ryzhikova K.A., Mirzayev K.B., Grishina E.A., Snalina N.E., Sozaeva Zh.A., Il'ina E.S., Grabuzdov A.M., Matsneva I.A. Comparison of CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, ABCB1, SLCO1B1 gene polymorphism frequency in Russian and Nanai populations. *Farmakogenetika i farmakogenomika* = *Pharmacogenetics and Pharmacogenomics*. 2016;2:12-18. (in Russian)
- Tabikhanova L.E., Osipova L.P. Analysis of the genetic and demographic structure of populations from Aginskii Buryat district contrasting in habitation conditions. *Russ. J. Genet*. 2012;48(12):1239-1246. DOI 10.1134/S1022795412110129.
- Tiis R.P., Osipova L.P., Churkina T.V., Tabikhanova L.E., Lichman D.V., Voronina E.N., Filipenko M.L. The ILE462VAL polymorphism of the cytochrome P450 CYP1A1 gene in the Tundra Nenets of the Yamalo-Nenets Autonomous Okrug, Nganasans of the Taimyr Peninsula, and Russians of Siberia. *Russ. J. Genet: Appl. Res*. 2016; 6(8):864-870. DOI 10.1134/S2079059716070133.
- The 1000 Genomes Project Consortium. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 2012;491(7422):56-65. DOI 10.1038/nature11632.
- Vineis P., Veglia F., Benhamou S., Butkiewicz D., Cascorbi I., Clapper M.L., Dolzan V., Haugen A., Hirvonen A., Ingelman-Sundberg M., Kihara M., Kiyohara C., Kremers P., Le Marchand L., Ohshima S., Pastorelli R., Rannug A., Romkes M., Schoket B., Shields P., Strange R.C., Stucker I., Sugimura H., Garte S., Gaspari L., Taioli E. CYP1A1 T3801 C polymorphism and lung cancer: a pooled analysis of 2451 cases and 3358 controls. *Int. J. Cancer*. 2003;104(5):650-657. DOI 10.1002/ijc.10995.
- Zhang Z., Pelletier R.D., Wong Y.N., Sugawara M., Zhao N., Littlefield B.A. Preferential inducibility of CYP1A1 and CYP1A2 by TCDD: Differential regulation in primary human hepatocytes versus transformed human cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2006; 341(2):399-407. DOI 10.1016/j.bbrc.2005.12.203.
- Zhou S.F. Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: Part I. *Clin. Pharmacokinet*. 2009;48(11):689-723. DOI 10.2165/11318030-000000000-00000.
- Zolotareva I.M. Anthropological type of modern Buryats. *Voprosy antropologii* = *Problems of Anthropology*. 1960;5:98-108. (in Russian)

Полиморфизм *T3111C* гена *Clock* у женщин русской и бурятской национальности

О.В. Калюзная, Н.В. Семенова, Т.А. Баирова, И.М. Мадаева, Е.В. Беляева , Л.И. Колесникова

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

В двух выборках женщин климактерического возраста русской и бурятской национальности, проживающих в Восточной Сибири (Иркутская область, г. Иркутск и Республика Бурятия, г. Улан-Удэ), изучена распространенность генотипов и аллелей *T3111C* полиморфизма гена циркадного ритма *Clock* (rs1801260). Для этого было проведено генотипирование образцов ДНК методом полимеразной цепной реакции. Показано, что сравниваемые группы статистически значимо отличаются по частоте встречаемости генотипов ($p = 0.001$). Обнаружено, что в выборке русских женщин больше частота *TC* генотипа ($p = 0.004$) и меньше частота *TT* генотипа ($p = 0.0001$) по сравнению с выборкой женщин из Бурятии. Аллель с измененной последовательностью *3111C* у русских женщин встречался в 30.4 % случаев, что статистически значимо чаще по сравнению с выборкой бурят, где доля аллеля *3111C* составила 19.3 % ($p = 0.014$).

Ключевые слова: циркадный ритм; гены; полиморфизм; популяция.

Polymorphism *T3111C* of the *Clock* gene in ethnic groups of women from Russia and Buryatia

O.V. Kaluzhnaya, N.V. Semenova, T.A. Bairova, I.M. Madaeva, E.V. Belyaeva , L.I. Kolesnikova

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

Biological rhythms of organisms depend on both changing conditions of the external environment and internal "biological clock". Circadian rhythms are the response of the organism to the change of day and night. They are some of the most important biological rhythms of organisms. Circadian rhythms are regulated by the group of circadian genes. It is known that women suffer from sleep disorders more often than men. Up to 50 % of menopausal women complain of problems associated with sleeping. The study involved 403 menopausal women aged from 45 to 60 years: 214 Russians (the average age is 52.74 ± 6.28 years) and 189 Buryats (the average age is 51.95 ± 5.13 years) living in Eastern Siberia (Irkutsk region, Irkutsk and Republic of Buryatia, Ulan-Ude). The prevalence of genotypes and alleles of the polymorphism *T3111C* of the circadian rhythm gene *Clock* (rs1801260) was studied in these groups. To this end, we conducted genotyping of DNA samples by polymerase chain reaction. It was shown that the compared groups have statistically significant differences in genotypes frequency ($p = 0.001$). It was found that in the group of Russian women the frequency of the *TC* genotype ($p = 0.004$) was significantly higher and the frequency of the *TT* genotype ($p = 0.0001$) was significantly lower than those in the sample of women of Buryatia. It was shown that in the group of Russian women allele *3111C* is found in 30.4 % of cases, which is statistically significantly more often than in the group of Buryat women, where the frequency of allele *3111C* was 19.3 % ($p = 0.014$).

Key words: circadian rhythm; genes; polymorphism; population.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Калюзная О.В., Семенова Н.В., Баирова Т.А., Мадаева И.М., Беляева Е.В., Колесникова Л.И. Полиморфизм *T3111C* гена *Clock* у женщин русской и бурятской национальности. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(2):212-216. DOI 10.18699/VJ18.349

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Kaluzhnaya O.V., Semenova N.V., Bairova T.A., Madaeva I.M., Belyaeva E.V., Kolesnikova L.I. Polymorphism *T3111C* of the *Clock* gene in ethnic groups of women from Russia and Buryatia. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(2):212-216. DOI 10.18699/VJ18.349 (in Russian)

Все живые организмы, от бактерий до высших млекопитающих и человека, подчиняются биологическим ритмам, которые зависят как от изменяющихся условий внешней среды, так и от внутренних «биологических часов» самих организмов (Dunlap, 1999; Dibner, Schibler, 2015). Суточные, или циркадные, ритмы – ответ организма на смену светлого и темного времени суток. Это одни из важнейших биологических ритмов организма, которые регулируются группой циркадных генов или генной сетью циркадного осциллята (Колчанов и др., 2013). К генам циркадного ритма относят: гены транскрипционных факторов *Clock* и *Bmal1*, гены светового периода *Per1*, *Per2*, *Per3*, гены криптохромов (Cryptochrome или белков светочувствительности), гены транскрипционных репрессоров *Cry1* и *Cry2*, ген *Tim* (Timeless), контролирующий ночной и дневной синтез белков (Dunlap, 1999; Kowalska et al., 2010), а также гены протеинкиназ *CSNKs* (Lowrey et al., 2000).

Регуляция работы генов циркадного ритма происходит по принципу транскрипционной обратной связи, при которой позитивную регуляцию выполняет гетеродимер транскрипционных факторов CLOCK/BMAL1, активируя гены *Per* и *Cry*, а негативную регуляцию (ингибирование) – комплекс PER/CRY, взаимодействуя с CLOCK/BMAL1, подавляя их активность и уровень собственной экспрессии (Dunlap, 1999; Соловьев и др., 2016). Циркадные гены вовлечены также в ряд биохимических и метаболических процессов, таких как репарация ДНК (Fu, Lee, 2003), обмен глюкозы и холестерина (Loria-Kohen et al., 2016), синтез гормонов (Чернышева, 2013) и многих других. Современная геронтология рассматривает изменение цикла сон–бодрствование как один из ключевых механизмов старения организма, в основе которого лежат изменения циркадианных ритмов (Pagani et al., 2010; Schmidt et al., 2012). В литературе показана взаимосвязь экспрессии генов циркадного ритма с патологиями сердечно-сосудистой системы, диабетом, развитием онкологических заболеваний, старением и депрессией (Fu, Lee, 2003; Коломейчук и др., 2011; Соловьев и др., 2016; Corella et al., 2016).

Одним из генов циркадного ритма является ген *Clock*, локализованный на длинном плече 4-й хромосомы человека в сайте q12 (<http://www.genecards.org>). Наличие однонуклеотидной замены *T3111C* (rs1801260) в 3'-нетранслируемой области гена приводит к изменению экспрессии белка CLOCK, структуры мРНК, что влияет на ее стабильность и способность связываться с молекулами-регуляторами (Ozburn et al., 2016).

В популяциях мира распространенность *3111C* аллеля имеет этническую особенность и существенно варьирует. Частота *3111C* аллеля среди жителей восточной Азии (Китай, Корея, Япония) составляет 10.1 %, в популяциях южной Азии (Индия, Пакистан, Бангладеш) 38.3 %, у африканцев 13–20 %, у европеоидов в среднем 30.5 % (www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population). Однако в описанных исследованиях участвовали лица обоего пола, без деления на возрастные группы, что затрудняет представление о роли *T3111C* полиморфизма гена *Clock* в циркадной ритмике, в зависимости от гендерных и возрастных особенностей.

Известно, что женщины чаще, чем мужчины, страдают нарушениями сна (Zhang, Wing, 2006). И если в фертильном возрасте те или иные проблемы, связанные со сном, отмечают 15 % женщин, то в менопаузе их число возрастает, по некоторым оценкам, от 25 до 50 % (Krystal et al., 1998; Owens, Matthews, 1998). В первую очередь, это может быть следствием физиологических изменений, происходящих в организме женщин.

В Научном центре проблем здоровья семьи и репродукции человека (г. Иркутск) проведен ряд исследований по изучению структуры нарушений сна у женщин в климактерическом периоде. Показано повышение активности процессов перекисного окисления липидов и угнетение системы антиоксидантной защиты, наиболее выраженное в постменопаузе (Kolesnikova et al., 2013). Кроме этого, выявлено, что при менопаузе нарушения сна у женщин связаны с измененной секрецией мелатонина в течение суток, однако уже в постменопаузе отмечено снижение секреции мелатонина у женщин как с нарушениями сна, так и без таковых (Мадаева и др., 2016).

Показано, что формирование и течение различных патологических состояний имеют этногенетические особенности (Баирова и др., 2013, 2014; Мадаева и др., 2013), что предполагает персонализированный подход к их коррекции и терапии. Целью настоящей работы был анализ частот встречаемости генотипов и аллелей полиморфизма *T3111C* (rs1801260) гена циркадного ритма *Clock* в двух выборках женщин климактерического возраста: русской и бурятской национальности.

Материалы и методы

Набор материала для исследования проводили в рамках экспедиционных работ в 2015–2016 гг. в Иркутской области (г. Иркутск) и Республике Бурятия (г. Улан-Удэ). В исследовании приняли участие 403 женщины климактерического периода в возрасте от 45 до 60 лет: европеоидная раса, этническая группа – русские ($n = 214$, средний возраст 52.74 ± 6.28 лет, индекс массы тела 27.71 ± 4.19 кг/м²) и монголоидная раса, этническая группа – буряты ($n = 189$, средний возраст 51.95 ± 5.13 лет, индекс массы тела 28.59 ± 3.01 кг/м²). Группы были сформированы с учетом генеалогического анамнеза (представители, имеющие в двух поколениях родителей одной этнической группы) и самоидентификации. Исследование проведено с информированного согласия женщин и соответствует этическим принципам Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (Бразилия, 2013 г.).

Программа обследования женщин включала следующие методы: клинико-анамнестические (общеклиническое и гинекологическое обследование), молекулярно-генетические и статистические. Критерии включения женщин в группу исследования: возраст 45–60 лет; концентрация фолликулоstimулирующего гормона (ФСГ) > 20 мЕд/мл; изменение ритма менструаций – олигоменорея или отсутствие менструальной функции в течение 12 мес.; параметры, выявляемые во время проведения УЗИ: несоответствие структуры и толщины эндометрия 1-й и 2-й фазе менструального цикла, М-эхо 0.5 см или меньше, истощение или отсутствие фолликулярного аппарата яичников.

Критериями исключения женщин из исследования были: применение заместительной гормональной терапии; декомпенсированные психические, неврологические, сердечно-сосудистые, эндокринные заболевания; обострение хронических заболеваний; наличие хронических нарушений сна в анамнезе; хирургическая менопауза; работа по сменам.

У каждого участника исследования отбирали кровь из локтевой вены в вакуумную пробирку с 3 % КЗЭДТА. Материалом для изучения полиморфного локуса *T311C* (rs1801260) служила геномная ДНК, выделенная из цельной венозной крови набором «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» (ООО «ИнтерЛабСервис», г. Москва), согласно инструкции производителя. Генотипирование полиморфных вариантов гена *Clock* проводили коммерческим набором производства компании «ТестГен» (г. Ульяновск) методом ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе ДТ-прайм (ООО «ДНК-технология», г. Москва). Аллель *3111C* детектировали по каналу Hex (Vic), аллель *3111T* – по каналу Fam.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы STATISTICA, версия 6.1 (StatSoft Inc., США (правообладатель лицензии ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»)). При сравнении частот генотипов использовали критерий χ^2 , при сравнении долей – критерий z . Нулевую гипотезу об отсутствии статистически значимых различий между группами отклоняли при уровне значимости 5 %.

Результаты и обсуждение

Проведено молекулярно-генетическое исследование *T311C* полиморфизма гена *Clock* у женщин климактерического возраста, представителей русской и бурятской этногрупп. В обеих выборках выявлены носители трех возможных генотипов по изученному полиморфизму (табл. 1).

Так как изученные нами выборки не являются репрезентативными выборками из популяций русских и бурят и включают только женщин старше 45 лет, равновесное соотношение частот аллелей, согласно закону Харди–Вайнберга, в данной работе не оценивалось. При сравнении частоты встречаемости генотипов *T311C* полиморфизма гена *Clock* между выборками женщин из разных этнических групп обнаружены статистически значимые различия ($\chi^2 = 13.406$; d.f. = 2; $p = 0.001$). В выборке русских женщин больше частота гетерозиготного *TC* генотипа ($\chi^2 = 8.32$; d.f. = 1; $p = 0.004$) и на 18 % меньше частота гомозиготного *TT* генотипа ($\chi^2 = 12.56$; d.f. = 1; $p = 0.0001$). При сравнении частоты аллелей между группами также наблюдаются

значимые отличия, аллель с измененной последовательностью *3111C* в выборке русских встречался чаще, чем в выборке бурят: 30.4 % против 19.3 % ($z = 2.447$; $p = 0.014$). Полученные результаты согласуются с представлением о том, что распространенность генотипов и аллелей *T311C* полиморфизма гена *Clock* варьирует в различных популяциях мира (www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population) (табл. 2).

Так, в выборке русских женщин частота аллеля *3111C* соответствует средневропейской, в то же время она статистически значимо больше, чем в популяциях жителей Японии ($p = 0.031$), Африки ($p = 0.009$), Южной Америки ($p = 0.004$), Китая ($p = 0.0001$) и Вьетнама ($p = 0.0001$), и меньше, чем в выборке индийцев из США ($p = 0.012$). Изученная выборка бурят по частоте аллеля *3111C* ближе всего находится к японской популяции и статистически значимо отличается от популяций жителей Вьетнама ($p = 0.020$) и Китая ($p = 0.007$), где частота аллеля *3111C* меньше. В изученной выборке бурят частота *3111C* аллеля отличается от европейских популяций из России (Карелия) ($p = 0.017$), Великобритании ($p = 0.004$) и Финляндии ($p = 0.0001$), а также от популяций бенгальцев ($p = 0.011$), индийцев из Пакистана ($p = 0.004$) и США ($p = 0.0001$), где частота аллеля *3111C* значимо больше.

Заключение

Одна из центральных задач современной сомнологии – изучение синхронизации и десинхронизации циркадных ритмов, зависящих как от внешних (экзогенных), так и внутренних (биологических) факторов. Десинхронизации биологических часов особенно подвержены женщины климактерического возраста, у которых бессонница часто является сопутствующим синдромом менопаузы. Результаты проведенного исследования выявили отличия по частоте встречаемости аллелей и генотипов по *T311C* полиморфизму гена *Clock* у женщин климактерического возраста русской и бурятской национальности. Показано, что в выборке русских женщин статистически значимо меньше частота гомозиготного *TT* генотипа и больше частота гетерозиготного *TC* генотипа и аллеля *3111C*, кодирующего белок с измененной экспрессией. Частота гомозиготного *CC* генотипа в сравниваемых группах не имеет существенных отличий, хотя в русской выборке наблюдается тенденция увеличения частоты *3111C* аллеля, где она на 4.3 % больше. Частота *3111C* аллеля в выборке русских находится на уровне среднего значения для европейских популяций, а в выборке бурят она ближе к японской популяции, но отличается от южных азиатов (Вьетнам, Китай). Дальнейшее изучение распространен-

Table 1. Percentages of genotypes for and alleles of the *T311C* polymorphism of the *Clock* gene in samples studied

Sample (n)	Genotype, n			Allele	
	TT	TC	CC	T	C
Russians (214)	110 (51.4)	78 (36.4)	26 (12.2)	0.696	0.304
Buryats (189)	131 (69.3)	43 (22.8)	15 (7.9)	0.807	0.193
Significance of differences	$\chi^2 = 13.406$; d.f. = 2; $p = 0.001$			$z = 2.447$; $p = 0.014$	

n, sample size.

Table 2. Percentages of the C allele of the T3111C polymorphism of the *Clock* gene in various populations of the world (www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population)

Population (n)	Percentage of the C allele	Significance
Indians (Texas, United States) (103)	45.6	$p^* = 0.012, p' = 0.0001$
Finns (Finland), (99)	41.9	$p^* = 0.062, p' = 0.0001$
Indians (Pakistan), (96)	35.9	$p^* = 0.408, p' = 0.004$
Indians (United Kingdom), (102)	35.3	$p^* = 0.457, p' = 0.004$
Bengalis (Bangladesh), (86)	34.3	$p^* = 0.603, p' = 0.011$
Russians (our data), (214)	30.4	$p' = 0.014$
Russians (Karelia), (224)	30.0	$p^* = 0.990, p' = 0.017$
Mexicans (United States), (64)	28.1	$p^* = 0.844, p' = 0.192$
Iberians (Spain), (107)	29.4	$p^* = 0.956, p' = 0.066$
Italians (Tuscany, Italy), (107)	29.0	$p^* = 0.897, p' = 0.077$
English (Great Britain), (91)	26.9	$p^* = 0.634, p' = 0.197$
Europeans (Utah, United States), (99)	25.3	$p^* = 0.428, p' = 0.304$
Colombians (Colombia), (94)	24.5	$p^* = 0.358, p' = 0.392$
Africans (Gambia, West Africa), (61)	20.5	$p^* = 0.176, p' = 0.984$
Buryats (our data), (189)	19.3	$p^* = 0.014$
Japanese (Tokyo, Japan), (104)	18.3	$p^* = 0.031, p' = 0.958$
Africans (Barbados Island), (96)	17.7	$p^* = 0.028, p' = 0.868$
Africans (Kenya, East Africa), (113)	16.4	$p^* = 0.009, p' = 0.633$
Afro-Americans (southern USA), (99)	14.6	$p^* = 0.004, p' = 0.406$
Chinese (Southern China), (93)	10.2	$p^* = 0.0001, p' = 0.076$
Vietnamese (Southern Vietnam), (99)	8.1	$p^* = 0.0001, p' = 0.020$
Chinese (Beijing, China), (103)	6.8	$p^* = 0.0001, p' = 0.007$

Designations: n, sample size, p^* , significance of differences from the Russian sample studied, p' , significance of differences from the Buryat sample studied.

ности полиморфных вариантов гена *Clock* в различных популяциях может внести вклад в понимание механизмов генетического контроля циркадных ритмов человека и возникновения нарушений сна как в целом в популяции, так и у женщин климактерического возраста.

Acknowledgments

This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 16-34-00093.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Bairova T.A., Dolgikh V.V., Kolesnikova L.I., Pervushina O.A. Nutri-
ciogenetics and risk factors of cardiovascular disorders: an associa-
tion study in Eastern Siberia populations. *Acta Biomedica Scienti-
fica*. 2013;4(92):87-92. (in Russian)
Bairova T.A., Kolesnikov S.I., Kolesnikova L.I., Pervushina O.A.,
Darenskaya M.A., Grebenkina L.A. Lipid peroxidation and mito-
chondrial superoxide dismutase-2 gene in adolescents with essential
hypertension. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny* =
Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2014;8(158):141-
144. DOI 10.1007/s10517-014-2717-4. (in Russian)
Chernysheva M.P. Circadian oscillators and hormones. *Tsitologiya* =
Cytology. 2013;11(55):761-777. (in Russian)

Corella D., Asensio E.M., Coltell O., Sorli J.V., Estruch R., Martinez-
Gonzalez M.A., Salas-Salvado J., Castaner O., Aros F., Lapetra J.,
Serra-Majem L., Gomes-Gracia E., Ortega-Azorin C., Fiol M., Espi-
noso J.D., Diaz-Lopez A., Fito M., Ros M., Ordovas J.M. CLOCK
gene variation is associated with incidence of type-2 diabetes and
cardiovascular diseases in type-2 diabetic subjects: dietary modu-
lation in the PREDIMED randomized trial. *Cardiovasc. Diabetol*.
2016;15(4):1-12. DOI 10.1186/s12933-015-0327-8.
Dibner C., Schibler U. Circadian timing of metabolism in animal mo-
dels and humans. *J. Intern. Med*. 2015;277(5):513-527. DOI 10.1111/
joim.12347.
Dunlap J.C. Molecular bases for circadian clocks. *Cell*. 1999;96(2):
271-290.
Fu L., Lee C.C. The circadian clock: pacemaker and tumor suppressor.
Nat. Rev. Cancer. 2003;3:350-361. DOI 10.1038/nrc1072.
Kolesnikova L.I., Madaeva I.M., Semenova N.V., Suturina L.V., Ber-
dina O.N., Sholohov L.F., Solodova E.I. Pathogenic role of melato-
nin in sleep disorders in menopausal women. *Bull. Exp. Biol. Med*.
2013;156(1):104-106.
Kolchanov N.A., Ignatieva E.V., Podkolodnaya O.A., Likhoshvai
V.A., Matushkin Yu.G. Gene Networks. *Vavilovskii Zhurnal
Genetiki i Selektii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*.
2013;17(4/2):833-850. (in Russian)
Kolomeichuk S.N., Makeeva I.V., Topchieva L.V., Korneva V.A., Nemo-
va N.N. Association of T3111C polymorphism in the 3'-untranslated
region of the *Clock* gene with the risk of essential arterial hyperten-
sion and coronary artery disease in the Russian population (residents

- of Karelia). *Genetika = Genetics (Moscow)*. 2011;47(10):1411-1415. DOI 10.7868/S001667581604010X. (in Russian)
- Kowalska E., Moriggi E., Bauer C., Dibner C., Brown S.A. The circadian clock starts ticking at a developmentally early stage. *J. Biol. Rhythms*. 2010;25:442-449. DOI 10.1177/0748730410385281.
- Krystal A.D., Edinger J., Wohlgemuth W., Marsh G.R. Sleep in perimenopausal and post-menopausal women. *Sleep Med. Rev.* 1998; 4(2):243-253.
- Loria-Kohen V., Espinosa-Salinas I., Marcos-Pasero H., Lourenço-Nogueira T., Herranz J., Molina S., Reglero G., Ramirez de Molina A. Polymorphism in the *CLOCK* gene may influence the effect of fat intake reduction on weight loss. *Nutrition*. 2016;32(4):453-460. DOI 10.1016/j.nut.2015.10.013.
- Lowrey P.L., Shimomura K., Antoch M.P., Yamazaki S., Zemenides P.D., Ralph M.R., Menaker M., Takahashi J.S. Positional synaptic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science*. 2000;288(5465):483-492.
- Madayeva I.M., Berdina O.N., Kolesnikova L.I., Bairova T.A., Ablamskaya O.N., Madaev V.V., Antonenko F.F. Ethnic features of sleep disorders in Eastern Siberia. *Acta Biomedica Scientifica*. 2013; 4(92):51-55. (in Russian)
- Madayeva I.M., Semenova N.V., Danusevich I.N., Kolesnikova L.I. Climacteric syndrome, sleep disorders, and melatonin. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*. 2016;19:86-93. (in Russian)
- Owens J.F., Matthews K.A. Sleep disturbance in healthy middle-aged women. *Maturitas*. 1998;30(1):41-50.
- Ozburn A.R., Purohit K., Parekh P.K., Kaplan G.N., Falcon E., Mukherjee S., Cates H.M., McClung C.A. Functional implications of the *CLOCK* 3111T/C single-nucleotide polymorphism. *Front. Psychiatry*. 2016;7(67):1-8. DOI 10.3389/fpsy.2016.00067.
- Pagani L., Semenova E.A., Moriggi E., Revell V.L., Hack L.M., Lockley S.W., Arendt J., Skene D.J., Meier F., Izakovic J., Wirz-Justice A., Cajochen C., Sergeeva O.J., Cheresiz S.V., Danilenko K.V., Eckert A., Brown S.A. The physiological period length of the human circadian clock in vivo is directly proportional to period in human fibroblasts. *PLoS ONE*. 2010; 5(10):1-17. DOI 10.1371/journal.pone.0013376.
- Schmidt C., Peigneux P., Cajochen C. Age-related changes in sleep and circadian rhythms: impact on cognitive performance and underlying neuroanatomical networks. *Front. Neurol.* 2012;3(118):1-11. DOI 10.3389/fneur.2012.00118.
- Solovyov I.A., Dobrovol'skaya E.V., Moskalev A.A. Genetic control of circadian rhythms and aging. *Genetika = Genetics (Moscow)*. 2016; 52(4):393-413. DOI 10.7868/S001667581604010X. (in Russian)
- Zhang B., Wing Y.K. Sex differences in insomnia: a meta-analysis. *Sleep*. 2006;29(1):85-93.
<http://www.genecards.org>
http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population



Выявление генов, вовлеченных в контроль белой окраски головы, у восьми российских пород крупного рогатого скота

Н.С. Юдин^{1,2}, Н.М. Белоногова¹, Д.М. Ларкин^{1,3}

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Королевский ветеринарный колледж, Лондонский университет, Лондон, Великобритания

Характерным признаком domestikации является нарушение пигментации, приводящее к появлению пегости, вплоть до равномерной белой окраски тела животного. Целью работы была идентификация районов генома и генов-кандидатов, связанных с частным вариантом пегости, белой окраской головы, у представителей восьми российских пород крупного рогатого скота. После фильтрации для полногеномного анализа ассоциаций был использован набор из 131 709 однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП). Ассоциативный анализ был проведен с помощью пакета EMMAX при использовании двух фенотипов: фенотип 1 – белая голова (при наличии преимущественно белого окраса) и туловище любого цвета (в том числе белого), фенотип 2 – белая голова и туловище обязательно небелого цвета. Для фенотипа 1 значимо ассоциированным оказался единственный ОНП BovineHD0500019319 на хромосоме 5. Этот же ОНП входил в состав кластера из трех значимых ОНП в районе 68803879–69365854 п. н., ассоциированного и с фенотипом 2. Внутри этого района находятся пять генов. Из них наиболее вероятным функциональным кандидатом является ген *SLC41A2*, в интроне которого локализован ОНП BovineHD0500019319. Ген *SLC41A2* кодирует белок потенциал-зависимого магниевого транспортера, который также может переносить ряд других катионов. Функция белка *SLC41A2* недостаточно изучена, однако известно, что другие белки этого семейства определяют окраску как кожи человека, так и шерсти животных. Положительные сигналы ассоциации для второго фенотипа обнаружены также на хромосомах 1–4, 6–15, 18, 19, 24, 27 и 29. Выявлено 37 районов генома крупного рогатого скота, достоверно ассоциированных с белой окраской головы.

Ключевые слова: крупный рогатый скот; аборигенный скот; порода; окраска; белая голова; полногеномный анализ ассоциаций; ген *SLC41A2*; domestikация.

Genes related to the white face colour pattern in eight Russian cattle breeds

N.S. Yudin^{1,2}, N.M. Belonogova¹, D.M. Larkin^{1,3}

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Royal Veterinary College, University of London, London, UK

One of the major effects of domestikation is change of animal coat colour to up to complete white colour of the whole body. It is possible that white colour of livestock animals had aesthetic significance for humans as well. The first step towards detection of genes and mutations controlling white colouring in animals is the genome-wide association studies. These studies, however, have not been done for the cattle breeds native to the Russian Federation. The aim of this study was therefore to identify genomic intervals and candidate genes that could be responsible for white face colouring in eight Russian cattle breeds. The data on genome-wide genotyping of 131,709 high-quality single nucleotide polymorphisms (SNPs) on 148 animals have been used in the program EMMAX. Association analysis has been performed using two related phenotypes: a) the white face with the rest of the body of any colour and b) white face with the rest of the body of different (non-white) colour. In the first case, the only statistically significant marker found was the SNP BovineHD0500019319 located on cattle chromosome (BTA) 5. The same SNP was the most significant within the cluster of three SNPs on BTA5: 68,803,879–69,365,854 associated also with the second phenotype. Five genes were found within this interval in the cattle genome, out of which the most likely functional candidate was *SLC41A2*, with the SNP BovineHD0500019319 found within its intronic sequence. *SLC41A2* encodes a magnesium transporter protein. However, the function of this gene is not well established. Other members of this gene family are the key genes controlling differences in human skin and animal coat colour. Additional significant association signals with the second phenotype have been detected in BTA 1–4, 6–15, 18, 19, 24, 27, and 29. Overall, 37 genomic intervals have been detected associated with white face colouring in eight Russian native cattle breeds.

Key words: cattle; native populations; breed; colouring; white face; genome-wide association studies; *SLC41A2*; domestikation.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Юдин Н.С., Белоногова Н.М., Ларкин Д.М. Выявление генов, вовлеченных в контроль белой окраски головы, у восьми российских пород крупного рогатого скота. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(2):217–223. DOI 10.18699/VJ18.350

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Yudin N.S., Belonogova N.M., Larkin D.M. Genes related to the white face colour pattern in eight Russian cattle breeds. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(2):217–223. DOI 10.18699/VJ18.350 (in Russian)

В ходе domestikации у животных, принадлежащих к разным таксонам, возникают сходные поведенческие, морфологические и физиологические модификации (отсутствие агрессивности по отношению к человеку; изменения окраски тела; морфологические деформации черепа, ушей и хвоста; более частые и внесезонные эстральные циклы, снижение веса мозга и размера зубов и т. д.) (Wilkins et al., 2014). Согласно концепции Д.К. Беляева, domestikация заключается в наследственном изменении поведения животных в условиях разведения в неволе, а многочисленные морфофизиологические преобразования домашних животных являются коррелированными ответами, связанными с селекцией по поведению (Belyaev, 1979; Трут, 2007). Один из характерных морфологических признаков domestikации – нарушение синтеза пигмента меланина, а также замедление темпов развития эмбриональных предшественников пигментных клеток (меланоцитов), приводящее к появлению белых пятен (пегости), вплоть до равномерной белой окраски тела (Прасолова, Трут, 1993). Такой фенотипический параллелизм наблюдается у крупного рогатого скота (КРС), лошадей, свиней, собак, кошек, американских норок, кур, голубей и др. (Трапезов, 2013; Ларкин, Юдин, 2016). Однако сходное изменение окраски даже у одного вида может быть связано с различными генами и биохимическими путями (Reissmann, Ludwig, 2013).

С развитием методов генотипирования ДНК стала возможной идентификация участков хромосом и отдельных генов, отвечающих за формирование окраски тела и пегости у животных, включая и сельскохозяйственные виды (Andersson, 2001; Seo et al., 2007; Cieslak et al., 2011; Schmutz, 2012). В настоящее время в геноме мыши (как наиболее изучаемого модельного вида) идентифицирован 171 ген, влияющий на окраску (Montoliu et al., 2017).

У млекопитающих меланоциты синтезируют два пигмента: эумеланин (черно-коричневые цвета) и феомеланин (желто-красные цвета) (D'Mello et al., 2016). В онтогенезе меланоциты образуются из клеток нервного валика (меланобластов). Созревание меланобластов, миграция и дифференцировка меланоцитов регулируются рядом сигнальных путей (например, endothelin receptor type B (EDNRB)/endothelin 3 (EDN3), v-kitHardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog (KIT)/KIT ligand (KITLG)) и транскрипционных факторов (например, microphthalmia associated transcription factor (MITF), paired box 3 (PAX3), sex-determining region Y (SRY), SRY-box 10 (SOX10)) (Sugumaran, Barek, 2016). Поэтому неудивительно, что при сравнении геномов пород домашних животных, отличающихся по окраске, в первую очередь находят следы селекции в генах *KIT*, *KITLG*, *MITF* и *PAX3* (Andersson, 2001; Schmutz, Berryere, 2007; Seo et al., 2007; Cieslak et al., 2011; Schmutz, 2012). При этом сходные фенотипы могут контролироваться различными генами как внутри одного вида, так и у разных видов. Например, присутствие или отсутствие пятнистости у крупного рогатого скота в ряде работ связывали с геном *KIT* (Seo et al., 2007; Schmutz, 2012), а у собак – с *MITF* (Schmutz, Berryere, 2007). Однако более вероятно, что в разных экспериментах и/или при рассмотрении многообразных вариантов окраски выявляется только часть генов окраски

(Andersson, 2009). Примером того, что схожая окраска может формироваться в результате разных биохимических процессов, является формирование белого окраса у лошадей, который связан с ранним поседением и определяется регуляторной мутацией (дупликацией) в интроне гена *STX17* (Rosengren Pielberg et al., 2008). Даже гены с большим эффектом (например, *KIT*) отвечают только за часть генетической дисперсии между пегими животными и животными с равномерной окраской, как было показано при сравнении семи пород КРС (Fontanesi et al., 2010).

Генетика пегости у домашних животных – предмет многочисленных исследований. К.Ф. Рулье установил порядок возникновения белых пятен у животных с равномерной окраской: у лошадей в первую очередь пятна появляются на передней части головы, между холкой и серединой гривы, и на животе, сзади передних ног; у коров белое пятно появляется сначала на лбу, ближе к рогам, или на вымени (Рулье, 1954). Классический генетический анализ позволил Т.А. Olson (1981, 1999) предположить, что в генетическом контроле пегости принимают участие шесть локусов: *S* (spotting), *R* (roan), *Bt* (belting), *Bl* (blaze), *Bc* (brockling) и *Cs* (colour-sided). Мутация, непосредственно влияющая на фенотип, определена в настоящее время только для локуса *R* (Seitz et al., 1999). Локус *S* у гибридов герефордов картирован на хромосому 6 между микросателлитными маркерами BM4528 и EL03 (Grosz, MacNeil, 1999). В этом районе и находится ген *KIT*. L. Liu с коллегами (2009) сообщили об идентификации другого локуса, контролирующего фенотип spotting, на хромосоме 22 у гибридов голштинской и джерсейской пород в районе гена *MITF*. Путем ресеквенирования этого гена у представителей четырех итальянских пород КРС L. Fontanesi с коллегами (2012) установлено, что данный локус явно контролирует пегий фенотип, но это не единственный генетический фактор, контролирующий пегость у итальянских пород. Полногеномный анализ ассоциаций пропорции черного цвета в окраске быков-голштинов показал, что три локуса (*KIT*, *MITF* и локус на хромосоме 8) объясняют 24 % дисперсии по этому признаку (Hayes et al., 2010), а остальная часть дисперсии находится под контролем большого числа локусов с малым эффектом. Полногеномный анализ ассоциаций пегости у китайских голштинов выявил положительные сигналы в районе генов *KIT*, *IGFBP7* и *PDGFRA* (Fan et al., 2014). Таким образом, наследование пегости у животных имеет сложную генетическую основу, соответствующую количественному признаку (или даже ряду признаков).

Ситуация усложняется еще больше, если рассматривать частные варианты окраски. Мы уже упоминали формирование белой окраски у лошадей, обусловленной ранним поседением (Rosengren Pielberg et al., 2008). Локус, определяющий наличие «опоясывающего» пятна у КРС бурой швицкой породы, картирован в теломерном районе хромосомы 3 (Drögemüller et al., 2009). Показано также наличие общего гаплотипа 336 тыс. п. н., ассоциированного с данным признаком, у животных трех пород КРС (Drögemüller et al., 2010). Исследование генетики пигментации вокруг глаз у породы флеквик выявило 12 локусов, статистически достоверно ассоциированных с этим фенотипом (Pausch et al., 2012). Часть из них содержала гены



Fig. 1. Exemplary images of cattle breeds from Russia with a white head.
(a) Kazakh Whiteheaded, (b) Kalmyk, (c) Kostroma, (d) Ukrainian Whiteheaded, (e) Yakut, (f) Yaroslavl.

KIT, *KITLG*, *ERBB3*, *PAX3* и *MITF*, в то время как другие участки включали гены с менее очевидным влиянием на окраску.

Таким образом, для всестороннего понимания генетики окраски необходимы исследования как общих паттернов (например, монотонность или пятнистость), так и частных случаев (например, пигментация вокруг глаз или наличие черных пятен на кончиках ушей). Одному из таких частных случаев окраски, наличию белой головы, и посвящена настоящая работа.

Ранее мы с помощью полногеномного генотипирования провели анализ генетической структуры популяций и выявили историю происхождения 18 отечественных пород КРС (Yurchenko et al., 2018). Нас заинтересовало, что наличие белой головы зачастую является определяющим признаком породы, включенным в ее название, например: казахская белоголовая или украинская белоголовая. Поэтому целью настоящей работы была идентификация районов генома и генов-кандидатов, контролирующих белую окраску головы, у представителей восьми российских пород с помощью полногеномного анализа ассоциаций с использованием ранее полученного набора данных по генотипированию и фенотипированию.

Материалы и методы

Формирование выборок животных подробно описано нами ранее (Yurchenko et al., 2018). Анализ был проведен на выборке из восьми пород КРС (таблица) по цифровым фотографиям животных. Фенотип «белая голова» определяли в соответствии с общепринятой классификацией для паттерна окраски КРС «белая морда» (white face) – морда животного должна быть частично или полностью белой (Olson, 1999; Klungland, Vage, 2000; Schmutz, 2012) (рис. 1). Границу между головой и шеей проводили по

Breed sets and phenotypes

Breed	No. of animals	No. of white-headed animals
Phenotype 1: white head, rest of the body of any colour (including white)		
Bestuzhev	20	0
Buryat	23	0
Kazakh Whiteheaded	17	17
Kalmyk	23	7
Kostroma	16	6
Ukrainian Whiteheaded	10	10
Yakut	23	4
Yaroslavl	16	16
Total	148	60
Phenotype 2: white head, rest of the body of a colour other than white		
Bestuzhev	20	0
Buryat	22	0
Kazakh Whiteheaded	17	17
Kalmyk	23	7
Kostroma	10	0
Ukrainian Whiteheaded	10	10
Yakut	18	0
Yaroslavl	12	12
Total	132	46

краю и углу нижней челюсти к вершине сосцевидного отростка и далее по верхней выйной линии до иниона (Юдичев и др., 2013).

После первоначального анализа фотографий для исследования были выбраны животные двух фенотипов (см. таблицу). В каждом из них голова считалась белой при наличии преимущественно белого окраса (более 80 % площади). Животные с фенотипом 1 имели белую голову и туловище любого цвета (в том числе белого). При фенотипе 2 белая голова обязательно сочеталась с туловищем небелого цвета.

Исследование выполнили на выборке из нескольких пород, поскольку проведение анализа ассоциаций на ряде пород может улучшить его результаты, выявляя районы генома, вовлеченные в формирование признака у разных популяций (Raven et al., 2014). Венозную кровь собирали в пробирки с антикоагулянтом (ЭДТА К-2). Исследование проведено с соблюдением Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным и одобрено Комиссией по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН (протокол № 37 от 28.11.2017).

ДНК выделяли из крови методом протеолитической обработки с последующей экстракцией фенолом (Sambrook, Russel, 2006). Генотипирование производили на чипе GeneSeek Genomic Profiler High-Density (GGP HD150K), содержащем около 139 тыс. однонуклеотидных полиморфных маркеров (ОНП). Фильтрацию ОНП выполняли с помощью программы PLINK (Purcell et al., 2007). Для полногеномного анализа ассоциаций использовали набор из 131 709 ОНП, оставшийся после исключения индивидов, генотипированных менее чем по 95 % всех ОНП; локусов, генотипированных менее чем у 99 % индивидов; ОНП с минимальной аллельной частотой менее 1 %; ОНП на половых хромосомах и с неизвестной хромосомной локализацией. Анализ проводили с помощью пакета EMMAX (Kang et al., 2010). Использовали статистическую модель $Y = B + SNP_j + e$, где Y – вектор фенотипических значений, B – фактор породы (матрица соответствия размером $n \times 8$, где n – общий объем выборки, 8 – число пород), SNP_j – вектор генотипов j -го ОНП и e – вектор остаточных ошибок. Для коррекции на множественные сравнения применяли поправку q -value < 0.05 (Storey, 2002). Гены внутри ассоциированных районов и в пределах ± 250 тыс. п. н. от них идентифицировали по сборке генома KPC UMD_3.1.1 с помощью браузера UCSC Genome Browser (Kent et al., 2002), с использованием референсного набора генов KPC (RefSeq).

Результаты и обсуждение

Значения факторов инфляции (λ), полученные при анализе наших данных, были 0.970 и 0.998 для первого и второго фенотипов соответственно. График (Q-Q plot) для обоих экспериментов представлен в Приложении 1¹. Для первого фенотипа значимо ассоциированным оказался единственный ОНП BovineHD0500019319 на хромосоме 5 (рис. 2; Приложение 2). Этот же ОНП входил в состав кластера из трех значимых ОНП в районе 68803879–69365854 п. н., ассоциированного со вторым фенотипом (см. Приложение

2), и был наиболее значимым из всех тестируемых ОНП (q -value = $2.88E-24$). Внутри района хромосомы 5 с координатами 68803879–69365854 п. н. локализованы пять генов: *SLC41A2*, *C5H12orf45*, *ALDH1L2*, *APPL2* и *C5H12orf75*. Из них наиболее вероятным функциональным кандидатом является ген *SLC41A2*, внутри интрона которого и находится ОНП BovineHD0500019319. Ген *SLC41A2* кодирует белок потенциал-зависимого транспортера магния и других катионов (Wabakken et al., 2003). При этом функция гена *SLC41A2* недостаточно изучена (Goytain, Quamme, 2005). Однако известно, что белки этого семейства (*SLC24A5*, *SLC36A1* и *SLC45A2*) входят в состав меланосом (Sharma et al., 2002). Мутации в генах *SLC24A5* и *SLC45A2* у человека вызывают альбинизм (Morice-Picard et al., 2014; Oki et al., 2017) и ассоциированы с цветом кожи и волос (Branicki et al., 2008; Basu Mallick et al., 2013). У рыбы *Danio rerio* мутации в гене *SLC45A2* приводят к гипопигментации кожи, которая исчезает при введении в эмбрионы соответствующей мПНК человека (Tsetskhladze et al., 2012). Делеция одного нуклеотида в гене *SLC45A2*, приводящая к образованию преждевременного стоп-кодона, обуславливает возникновение альбинизма у собак породы бульмастиф (Caduff et al., 2017). У овец уровень экспрессии мПНК *SLC45A2* на черных участках кожи существенно выше, чем на белых (Wang et al., 2016). У малой пустельги интенсивность оранжевого и светло-коричневого окраса оперения зависит от уровня экспрессии мПНК *SLC45A2* (Galván et al., 2017). Уровень экспрессии мПНК *SLC45A2* в коже у особей красной тилапии с пятнистой черной окраской выше, чем у особей с равномерной розовой окраской (Zhu et al., 2016). Характерная ярко-желтая, янтарная или оранжевая окраска радужной оболочки глаза (так называемый тигринный глаз) у лошадей породы Пасо Фино – также следствие мутаций в этом гене (Mack et al., 2017). У человека ген *SLC41A2* имеет схожий паттерн тканевой экспрессии с генами *SLC45A2* и *SLC24A5*, в том числе они экспрессируются в коже (BioGPS, 2017).

Положительные сигналы ассоциации для второго фенотипа обнаружены также на хромосомах 1–4, 6–15, 18, 19, 24, 27 и 29. Среди них привлекают внимание два района на хромосомах 7 и 10 (ОНП BovineHD0700006334 и Нармар32991-BTA-125837 соответственно). На хромосоме 7 в этом районе локализованы гены *IL13*, *RAD50*, *IL5* и *IRF1*. Повышенное выделение интерлейкина 13 Т-клетками-хелперами второго типа наблюдается в диспластических родинках (невусах), представляющих собой внутридермальные или субэпидермальные скопления меланоцитов (Mitsui et al., 2016). Ген *RAD50* связан с гиперпигментацией и, по-видимому, подвергался отбору на фотопротекцию у африканских этнических групп (Izagirre et al., 2006). Интерлейкин 5 подавляет выработку меланина клетками глии после травматического повреждения периферического нерва (Rizvi et al., 2002). Белок IRF1 обуславливает наличие черно-белых полосок на плавниках у африканской рыбы *Neolamprologus meeli* (Ahi, Sefc, 2017).

На хромосоме 10 вблизи ОНП Нармар32991-BTA-125837 находятся гены *VXS2* и *ABCD4*. Экспрессия белка Chx10, кодируемого геном *VXS2*, в развивающихся

¹ Приложения 1 и 2 см. по адресу:

<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2018-22/appx4.pdf>

клетках пигментного эпителия сетчатки мыши приводит к подавлению образования в них пигмента (Rowan et al., 2004).

ОНП BovineHD0400024003 на хромосоме 4 находится вблизи гена *WNT16*. Ранее с помощью полногеномного анализа ассоциаций было показано, что этот ген контролирует интенсивность черной окраски и степень пигментации сосков у коров голштинской породы в Китае (Fan et al., 2014). Ген *PPFIBP1*, расположенный вблизи ОНП BovineHD0500023392 на хромосоме 5, кодирует белок, относящийся к семейству липринов. Один из членов этого семейства ассоциирован с развитием меланомы (Luo et al., 2016). Сигнал на хромосоме 15 в районе ОНП BovineHD1500022401 может быть связан с геном *CRY2*. Показано, что белковый продукт этого гена обуславливает циркадный ритм пигментации волосных фолликулов у человека (Hardman et al., 2015).

Интересно, что белая окраска головы характерна для ряда пород мясного направления селекции (казахская белоголовая и калмыцкая). Между тем вблизи ОНП Нармар32991-ВТА-125837 находится ген *ZNF410*, который при полногеномном анализе ассоциаций связан со структурой мышечных волокон, содержанием межмышечного жира и нежностью мяса у африканских пород мясного скота (Taye et al., 2017).

Район на хромосоме 11 с координатами 19.5 млн п. н. хотя и не содержит явных генов-кандидатов, которые могли бы влиять на окраску, тем не менее попадает в один из 12 локусов, ассоциированных с пигментацией вокруг глаз у КРС породы флетвик (Pausch et al., 2012). При этом ОНП BovineHD1100005968 находится на расстоянии всего в 156 тыс. п. н. от ОНП ВТВ-00753516, который был наиболее статистически значимым для этого локуса в работе Н. Pausch с коллегами (2012). Фенотип пигментации вокруг глаз в нашей выборке присутствовал у животных ярославской, серой украинской и калмыцкой пород. Так что вполне возможно, что в случае фенотипа 2 мы выявили район генома, связанный с пигментацией вокруг глаз.

В результате полногеномного анализа ассоциаций нами идентифицировано несколько локусов, которые потенциально могут участвовать в формировании фенотипа «белая голова» у восьми российских пород КРС. Эти локусы не содержат ранее идентифицированных основных генов окраски, хотя один локус перекрывается с ранее определенным районом, который был ассоциирован частным случаем фенотипа окраски головы у КРС (пигментация вокруг глаз). Причиной этого могут быть два фактора: 1) большое число пород в нашей выборке, предполагающее выявление общих межпородных локусов, тем самым снижение количества выявленных районов (как и наблюдалось для фенотипа 1); 2) структура выборки. В нашей работе использованы тауриновые породы КРС как европейского, так и азиатского происхождения (якутская, бурятская, калмыцкая). Существует гипотеза, что тауриновые породы азиатского происхождения – результат независимой доместикации *Bos taurus* в Азии (Zhang et al., 2013), что подстегивается и их сильной дивергенцией от других тауриновых пород (Yurchenko et al., 2018). Не исключено, что мы выявляем только те гены, которые имеют схожий эффект у филогенетически удаленных пород.

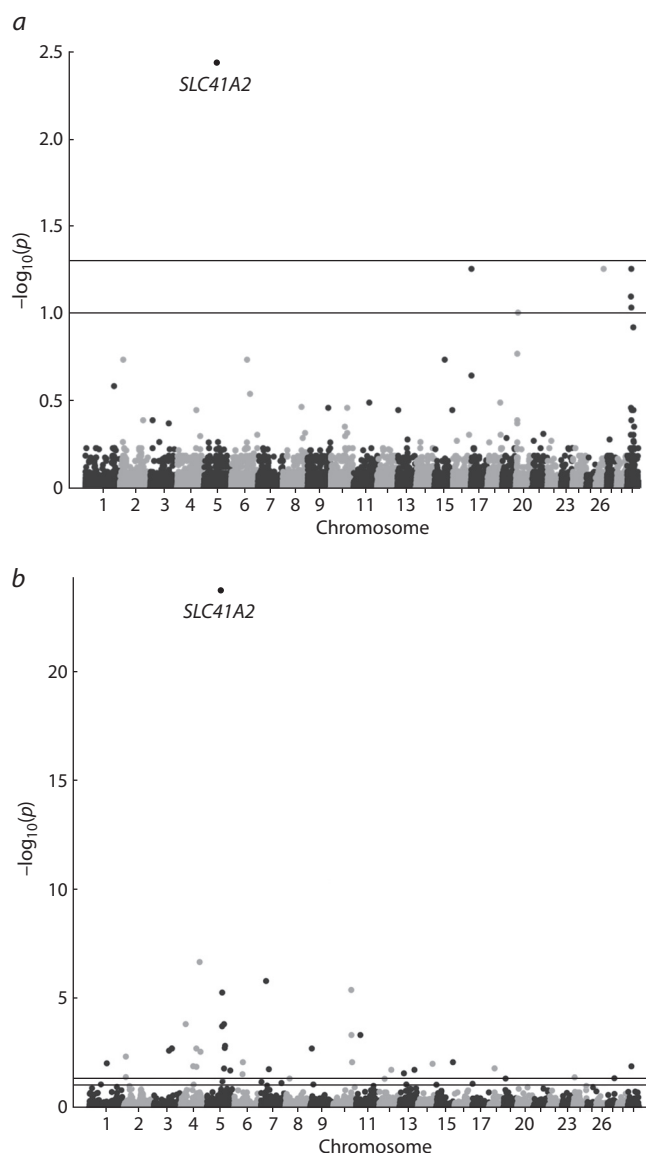


Fig. 2. Genome-wide association analysis of white head colouring in Russian cattle breeds.

(a) Phenotype 1: white head and the rest of the body of any colour (including white). (b) Phenotype 2: white head and the rest of the body of a colour other than white. SNPs sorted by autosome location: $-\log_{10}$ of raw p-values. The upper and lower horizontal lines indicate q-values of < 0.05 and < 0.10 , respectively.

Весьма вероятно, что имеет место и эффект, связанный с малым размером нашей выборки.

Таким образом, в ходе нашего исследования выявлено 37 районов генома КРС, ассоциированных с типом окраски головы. При этом наиболее достоверный сигнал получен в районе хромосомы 5 с координатами 68.8–69.4 млн п. н., содержащем ген *SLC41A2* – представителя генного семейства, несколько членов которого определяют окраску как кожи человека, так и шерсти животных. Полученные результаты можно использовать для последующего анализа этого района генома пород КРС с помощью секвенирования с целью поиска конкретных мутаций, приводящих к формированию белой окраски и пегости у ряда российских пород КРС.

Acknowledgments

This study was supported by the Russian Science Foundation, project 16-14-00090.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Ahi E.P., Sefc K.M. A gene expression study of dorso-ventrally restricted pigment pattern in adult fins of *Neolamprologus meeli*, an African cichlid species. *PeerJ*. 2017;5:e2843. DOI 10.7717/peerj.2843.
- Andersson L. Genetic dissection of phenotypic diversity in farm animals. *Nat. Rev. Genet.* 2001;2(2):130-138. DOI 10.1038/35052563.
- Andersson L. Genome-wide association analysis in domestic animals: a powerful approach for genetic dissection of trait loci. *Genetica*. 2009;136:341-349. DOI 10.1007/s10709-008-9312-4.
- Basu Mallick C., Iliescu F.M., Möls M., Hill S., Tamang R., Chaubey G., Goto R., Ho S.Y., Gallego Romero I., Crivellaro F., Hudjashov G., Rai N., Metspalu M., Mascie-Taylor C.G., Pitchappan R., Singh L., Mirazon-Lahr M., Thangaraj K., Vilems R., Kivisild T. The light skin allele of SLC24A5 in South Asians and Europeans shares identity by descent. *PLoS Genet.* 2013;9(11):e1003912. DOI 10.1371/journal.pgen.1003912.
- Belyaev D.K. Destabilizing selection as a factor in domestication. *J. Hered.* 1979;70:301-308.
- BioGPS. SLC41A2 (solute carrier family 41 member 2). 2017. Available at <http://biogps.org/#goto=genereport&id=84102>.
- Branicki W., Brudnik U., Draus-Barini J., Kupiec T., Wojas-Pelc A. Association of the SLC45A2 gene with physiological human hair colour variation. *J. Hum. Genet.* 2008;53(11-12):966-971. DOI 10.1007/s10038-008-0338-3.
- Caduff M., Bauer A., Jagannathan V., Leeb T. A single base deletion in the SLC45A2 gene in a Bullmastiff with oculocutaneous albinism. *Anim. Genet.* 2017;48(5):619-621. DOI 10.1111/age.12582.
- Cieslak M., Reissmann M., Hofreiter M., Ludwig A. Colours of domestication. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2011;86(4):885-899. DOI 10.1111/j.1469-185X.2011.00177.x.
- D'Mello S.A., Finlay G.J., Baguley B.C., Askarian-Amiri M.E. Signaling pathways in melanogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 2016;17(7). pii: E1144. DOI 10.3390/ijms17071144.
- Drögemüller C., Demmel S., Engensteiner M., Rieder S., Leeb T. A shared 336 kb haplotype associated with the belt pattern in three divergent cattle breeds. *Anim. Genet.* 2010;41:304-307. DOI 10.1111/j.1365-2052.2009.01987.x.
- Drögemüller C., Engensteiner M., Moser S., Rieder S., Leeb T. Genetic mapping of the belt pattern in Brown Swiss cattle to BTA3. *Anim. Genet.* 2009;40:225-229. DOI 10.1111/j.1365-2052.2008.01826.x.
- Fan Y., Wang P., Fu W., Dong T., Qi C., Liu L., Guo G., Li C., Cui X., Zhang S., Zhang Q., Zhang Y., Sun D. Genome-wide association study for pigmentation traits in Chinese Holstein population. *Anim. Genet.* 2014;45(5):740-744. DOI 10.1111/age.12189.
- Fontanesi L., Scotti E., Russo V. Analysis of SNPs in the KIT gene of cattle with different coat colour patterns and perspectives to use these markers for breed traceability and authentication of beef and dairy products. *Ital. J. Anim. Sci.* 2010;9:e42. DOI 10.4081/ijas.2010.e42.
- Fontanesi L., Scotti E., Russo V. Haplotype variability in the bovine MITF gene and association with piebaldism in Holstein and Simmental cattle breeds. *Anim. Genet.* 2012;43:250-256. DOI 10.1111/j.1365-2052.2011.02242.x.
- Galván I., Moraleda V., Otero I., Álvarez E., Inácio Â. Genetic favouring of pheomelanin-based pigmentation limits physiological benefits of coloniality in lesser kestrels *Falco naumanni*. *Mol. Ecol.* 2017; 26(20):5594-5602. DOI 10.1111/mec.14322.
- Goytain A., Quamme G.A. Functional characterization of the human solute carrier, SLC41A2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 330:701-705. DOI 10.1016/j.bbrc.2005.03.037.
- Grosz M.D., MacNeil M.D. The "spotted" locus maps to bovine chromosome 6 in a Hereford-cross population. *J. Hered.* 1999;90:233-236.
- Hardman J.A., Haslam I.S., Farjo N., Farjo B., Paus R. Thyroxine differentially modulates the peripheral clock: lessons from the human hair follicle. *PLoS ONE*. 2015;10(3):e0121878. DOI 10.1371/journal.pone.0121878.
- Hayes B.J., Pryce J., Chamberlain A.J., Bowman P.J., Goddard M.E. Genetic architecture of complex traits and accuracy of genomic prediction: coat colour, milk-fat percentage, and type in Holstein cattle as contrasting model traits. *PLoS Genet.* 2010;6(9):e1001139. DOI 10.1371/journal.pgen.1001139.
- Izagirre N., García I., Junquera C., de la Rúa C., Alonso S. A scan for signatures of positive selection in candidate loci for skin pigmentation in humans. *Mol. Biol. Evol.* 2006;23(9):1697-1706. DOI 10.1093/molbev/msl030.
- Kang H.M., Sul J.H., Service S.K., Zaitlen N.A., Kong S.Y., Freimer N.B., Sabatti C., Eskin E. Variance component model to account for sample structure in genome-wide association studies. *Nat. Genet.* 2010;42(4):348-354. DOI 10.1038/ng.548.
- Kent W.J., Sugnet C.W., Furey T.S., Roskin K.M., Pringle T.H., Zahler A.M., Haussler D. The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* 2002;12(6):996-1006.
- Klungland H., Vage D.I. Molecular genetics of pigmentation in domestic animals. *Curr. Genomics*. 2000;1:232-242.
- Larkin D.M., Yudin N.S. The genomes and history of domestic animals. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2016;4:123-128. (in Russian)
- Liu L., Harris B., Keehan M., Zhang Y. Genome scan for the degree of white spotting in dairy cattle. *Anim. Genet.* 2009;40:975-977. DOI 10.1111/j.1365-2052.2009.01936.x.
- Luo M., Mengos A.E., Mandarino L.J., Sekulic A. Association of liprin β -1 with kank proteins in melanoma. *Exp. Dermatol.* 2016;25(4):321-323. DOI 10.1111/exd.12933.
- Mack M., Kowalski E., Grahn R., Bras D., Penedo M.C.T., Bellone R. Two variants in SLC24A5 are associated with "tiger-eye" iris pigmentation in Puerto Rican Paso Fino horses. *G3 (Bethesda)*. 2017; 7(8):2799-2806. DOI 10.1534/g3.117.043786.
- Mitsui H., Kiecker F., Shemer A., Cannizzaro M.V., Wang C.Q.F., Gulati N., Ohmatsu H., Shah K.R., Gilleaudeau P., Sullivan-Whalen M., Cueto I., McNutt N.S., Suárez-Fariñas M., Krueger J.G. Discrimination of dysplastic nevi from common melanocytic nevi by cellular and molecular criteria. *J. Invest. Dermatol.* 2016;136(10):2030-2040. DOI 10.1016/j.jid.2015.11.035.
- Montoliu L., Oetting W.S., Bennett D.C. Color Genes. European Society for Pigment Cell Research. 2017. Available at <http://www.espcr.org/micemut>.
- Morice-Picard F., Lasseaux E., François S., Simon D., Rooryck C., Bieth E., Colin E., Bonneau D., Journel H., Walraedt S., Leroy B.P., Meire F., Lacombe D., Arveiler B. SLC24A5 mutations are associated with non-syndromic oculocutaneous albinism. *J. Invest. Dermatol.* 2014;134(2):568-571. DOI 10.1038/jid.2013.360.
- Oki R., Yamada K., Nakano S., Kimoto K., Yamamoto K., Kondo H., Kubota T. A Japanese family with autosomal dominant oculocutaneous albinism type 4. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2017;58(2):1008-1016. DOI 10.1167/iov.16-20612.
- Olson T.A. The genetic basis for piebald patterns in cattle. *J. Hered.* 1981;72:113-116.
- Olson T.A. Genetics of color variation. *The Genetics of Cattle*. Ed. R. Fries, A. Ruvinsky. Wallingford, 1999;33-53.
- Pausch H., Wang X., Jung S., Krogmeier D., Edel C., Emmerling R., Götz K.U., Fries R. Identification of QTL for UV-protective eye area pigmentation in cattle by progeny phenotyping and genome-wide association analysis. *PLoS ONE*. 2012;7:e36346. DOI 10.1371/journal.pone.0036346.
- Prasolova L.A., Trut L.N. Effect of the "Star" gene on the rate of melanoblast migration in silver fox (*Vulpes vulpes*) embryos.

- Doklady RAN = Proceedings of the Russian Academy of Sciences. 1993;329: 787-789. (in Russian)
- Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira M.A., Bender D., Maller J., Sklar P., de Bakker P.I., Daly M.J., Sham P.C. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* 2007;81(3):559-575. DOI 10.1086/519795.
- Raven L.A., Cocks B.G., Hayes B.J. Multibreed genome wide association can improve precision of mapping causative variants underlying milk production in dairy cattle. *BMC Genomics.* 2014;15:62. DOI 10.1186/1471-2164-15-62.
- Reissmann M., Ludwig A. Pleiotropic effects of coat colour-associated mutations in humans, mice and other mammals. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2013;24(6-7):576-586. DOI 10.1016/j.semcdb.2013.03.014.
- Rizvi T.A., Huang Y., Sidani A., Atit R., Largaespada D.A., Boissy R.E., Ratner N. A novel cytokine pathway suppresses glial cell melanogenesis after injury to adult nerve. *J. Neurosci.* 2002;22(22):9831-9840.
- Rosengren Pielberg G., Golovko A., Sundström E., Curik I., Lennartsson J., Seltnerhammer M.H., Druml T., Binns M., Fitzsimmons C., Lindgren G., Sandberg K., Baumung R., Vetterlein M., Strömberg S., Grabherr M., Wade C., Lindblad-Toh K., Pontén F., Heldin C.H., Sölkner J., Andersson L. A cis-acting regulatory mutation causes premature hair graying and susceptibility to melanoma in the horse. *Nat. Genet.* 2008;40:1004-1009. DOI 10.1038/ng.185.
- Rouillier K. Selected Biological Works. Moscow: USSR Academy of Sciences Publ., 1954. (in Russian)
- Rowan S., Chen C.M., Young T.L., Fisher D.E., Cepko C.L. Transdifferentiation of the retina into pigmented cells in ocular retardation mice defines a new function of the homeodomain gene Chx10. *Development.* 2004;131(20):5139-5152. DOI 10.1242/dev.01300.
- Sambrook J., Russell D.W. The Condensed Protocols from Molecular Cloning: a Laboratory Manual. N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006.
- Schmutz S.M. Genetics of Coat Color in Cattle. *Bovine Genomics.* Ed. J. Womack. Oxford, 2012;20-33.
- Schmutz S.M., Berryere T.G. Genes affecting coat colour and pattern in domestic dogs: a review. *Anim. Genet.* 2007;38:539-549.
- Sharma S., Wagh S., Govindarajan R. Melanosomal proteins – role in melanin polymerization. *Pigment Cell Res.* 2002;15(2):127-133. DOI 10.1034/j.1600-0749.2002.1o076.x.
- Seitz J.J., Schmutz S.M., Thue T.D., Buchanan F.C. A missense mutation in the bovine MGF gene is associated with the roan phenotype in Belgian Blue and Shorthorn cattle. *Mamm. Genome.* 1999;10: 710-712.
- Seo K., Mohanty T.R., Choi T., Hwang I. Biology of epidermal and hair pigmentation in cattle: a mini-review. *Vet. Dermatol.* 2007;18(6): 392-400. DOI 10.1111/j.1365-3164.2007.00634.x.
- Storey J.D. A direct approach to false discovery rates. *J. R. Stat. Soc. Ser. B.* 2002;64:479-498. DOI 10.1111/1467-9868.00346.
- Sugumaran M., Berek H. Critical analysis of the melanogenic pathway in insects and higher animals. *Int. J. Mol. Sci.* 2016;17(10):1753. DOI 10.3390/ijms17101753.
- Taye M., Kim J., Yoon S.H., Lee W., Hanotte O., Dessie T., Kemp S., Mwai O.A., Caetano-Anolles K., Cho S., Oh S.J., Lee H.K., Kim H. Whole genome scan reveals the genetic signature of African Ankole cattle breed and potential for higher quality beef. *BMC Genet.* 2017;18(1):11. DOI 10.1186/s12863-016-0467-1.
- Trapesov O.V. Domestication as the earliest intellectual achievement of mankind. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2013;17(4/2):872-883. (in Russian)
- Trut L.N. Domestication of animals as the historical process and as the experiment. *Informatsionnyy vestnik VOGiS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeders.* 2007;11(2):273-289. (in Russian)
- Tsetskhladze Z.R., Canfield V.A., Ang K.C., Wentzel S.M., Reid K.P., Berg A.S., Johnson S.L., Kawakami K., Cheng K.C. Functional assessment of human coding mutations affecting skin pigmentation using zebrafish. *PLoS ONE.* 2012;7(10):e47398. DOI 10.1371/journal.pone.0047398.
- Wabakken T., Rian E., Kveine M., Aasheim H.C. The human solute carrier SLC41A1 belongs to a novel eukaryotic subfamily with homology to prokaryotic MgtE Mg²⁺ transporters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003;306(3):718-724.
- Wang H., Xue L., Li Y., Zhao B., Chen T., Liu Y., Chang L., Wang J. Distribution and expression of SLC45A2 in the skin of sheep with different coat colors. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2016;54(3):143-150. DOI 10.5603/FHC.a2016.0015.
- Wilkins A.S., Wrangham R.W., Fitch W.T. The “domestication syndrome” in mammals: a unified explanation based on neural crest cell behavior and genetics. *Genetics.* 2014;197(3):795-808. DOI 10.1534/genetics.114.165423.
- Yudichev Yu.F., Degtyarev V.V., Khonin G.A. *Anatomiya zhivotnykh. Tom 1 [Animal Anatomy. Vol. 1].* Orenburg: OGAU Publ., 2013. (in Russian)
- Yurchenko A., Yudin N., Aitnazarov R., Plyusnina A., Brukhin V., Soloshenko V., Lhasaranov B., Popov R., Paronyan I.A., Plemyashov K.V., Larkin D.M. Genome-wide genotyping uncovers genetic profiles and history of the Russian cattle breeds. *Heredity.* 2018; 120(2):125-137. DOI 10.1038/s41437-017-0024-3.
- Zhang H., Pajmans J.L., Chang F., Wu X., Chen G., Lei C., Yang X., Wei Z., Bradley D.G., Orlando L., O'Connor T., Hofreiter M. Morphological and genetic evidence for early Holocene cattle management in northeastern China. *Nat. Commun.* 2013;4:2755. DOI 10.1038/ncomms3755.
- Zhu W., Wang L., Dong Z., Chen X., Song F., Liu N., Yang H., Fu J. Comparative transcriptome analysis identifies candidate genes related to skin color differentiation in red tilapia. *Sci. Rep.* 2016;6:31347. DOI 10.1038/srep31347.

Идентификация и генетическая характеристика этиологического агента пироплазмидоза лошадей на территории Западной и Восточной Сибири

В.А. Рар¹✉, В.А. Марченко², Е.А. Ефремова³, О.В. Сунцова⁴, О.В. Лисак⁴, А.Ю. Тикун¹, И.В. Мельцов⁵, Н.В. Тикун¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Горно-Алтайский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Республика Алтай, с. Майма, Россия

³ Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока, Новосибирская область, пос. Краснообск, Россия

⁴ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, Россия

⁵ Иркутский государственный аграрный университет им. А.А. Ежевского, Иркутская область, пос. Молодежный, Россия

Пироплазмидоз лошадей – природно-очаговая инфекция, вызываемая простейшими гемопаразитами отряда *Piroplasmida* *Babesia caballi* и *Theileria equi*. Животные, выздоровевшие после пироплазмидоза, остаются в течение длительного времени резервуарами инфекции и могут передавать патогены клещам-переносчикам. Случаи пироплазмидоза лошадей периодически отмечают в различных регионах Сибири, но до настоящего времени возбудители пироплазмидозов лошадей в России не были генетически охарактеризованы. Цель данной работы – изучение инфицированности лошадей из Новосибирской и Иркутской областей и из Республики Алтай возбудителями пироплазмидоза; установление видовой принадлежности выявленных возбудителей и их генетическая характеристика. Исследованы образцы крови от 155 лошадей на наличие ДНК бабезий и тейлерий методом двухраундовой ПЦР с последующим секвенированием положительных образцов. ДНК *T. equi* обнаружена в образцах крови у 57.9, 38.5 и 65.0 % лошадей из Новосибирской, Иркутской областей и Республики Алтай соответственно. Инфицированные животные были зарегистрированы практически во всех населенных пунктах, включенных в настоящую работу, что свидетельствует о том, что большинство исследованных мест являются эндемичными по тейлериозу лошадей. Следует отметить, что ДНК *B. caballi* не обнаружена ни в одном из исследованных образцов, несмотря на то, что раньше данный возбудитель детектировался во многих районах России, в том числе и на Алтае. На основании анализа нуклеотидных последовательностей гена 18S рРНК образцы *T. equi* относились к двум из четырех известных генетических групп, существенно различающихся между собой по последовательностям варибельной (V4) области гена. Все последовательности *T. equi* группы В были идентичны между собой и соответствовали последовательностям, выявленным в крови лошадей из Китая и Кореи, а последовательности *T. equi* группы А различались между собой одной-пятью заменами и соответствовали последовательностям, обнаруженным в крови лошадей из Индии и Бразилии, или отличались от них единичными заменами. Следует отметить, что в настоящем исследовании впервые подтверждено генетически наличие этиологического агента пироплазмидоза в образцах крови лошадей на территории России.

Ключевые слова: пироплазмидоз лошадей; *Theileria equi*; филогенетический анализ; ген 18S рРНК; Сибирь.

Identification of the etiological agent of equine piroplasmosis in Western and Eastern Siberia

V.A. Rar¹✉, V.A. Marchenko², E.A. Efremova³, O.V. Suntsova⁴, O.V. Lisak⁴, A.Y. Tikunov¹, I.V. Meltsov⁵, N.V. Tikunova¹

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Gorno-Altay Research Institute of Agriculture, Republic of Altay, Mayma, Russia

³ Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East, Novosibirsk region, Krasnoobsk, Russia

⁴ Scientific Center of Family Health Problems and Human Reproduction, Irkutsk, Russia

⁵ Irkutsk State Agrarian University named after A.A. Ezhevsky, Irkutsk region, Molodezhny settlement, Russia

Equine piroplasmosis is a natural tick-borne infection caused by hemoprotozoan parasites of the order *Piroplasmida*, *Babesia caballi* and *Theileria equi*. Animals that recover from piroplasmosis remain persistently infected carriers and can transmit pathogens to vector ticks. Cases of equine piroplasmosis are periodically observed in Siberia, however, no agent of equine piroplasmosis has yet been genetically characterized in Russia. The aim of this work was studying the prevalence of the infectious agents of piroplasmosis in horses from Siberia and genotyping the detected agents. Blood samples from 155 horses were examined for the presence of *Babesia* and *Theileria* DNA by nested PCR with the subsequent sequencing of positive samples. DNA of *T. equi* was found in blood samples from 57.9 %, 38.5 % and 65.0 % of horses from Novosibirsk province, Irkutsk province, and the Republic of Altai, respectively. *T. equi* DNA was found in the samples from almost all sampling sites included in this study, indicating that most of the studied sites are endemic for equine theileriosis. Surprisingly, DNA of *B. caballi* was not found in any of the samples examined, even though this agent had previously been detected in many regions in Russia, including Altai. The analysis of the determined 18S rRNA gene sequences demonstrated that *T. equi* samples belonged to two genetic groups, which differed significantly by the sequences of the variable (V4) region of the gene. All *T. equi* sequences from group B were identical and corresponded to *T. equi* sequences found in the blood of

horses from China and Korea, while *T. equi* sequences from group A differed by 1–5 nucleotide substitutions and were identical to the sequences from the blood of horses from India and Brazil or differed from them by single mismatches. Notably, in this study the presence of etiological agent of piroplasmosis in blood samples from horses in Russia was genetically confirmed for the first time.

Key words: equine piroplasmosis; *Theileria equi*; phylogenetic analysis; 18S rRNA gene; Siberia.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Рар В.А., Марченко В.А., Ефремова Е.А., Сунцова О.В., Лисак О.В., Тикунов А.Ю., Мельцов И.В., Тикунова Н.В. Идентификация и генетическая характеристика этиологического агента пироплазмидоза лошадей на территории Западной и Восточной Сибири. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(2):224–229. DOI 10.18699/VJ18.351

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Rar V.A., Marchenko V.A., Efremova E.A., Suntsova O.V., Lisak O.V., Tikunov A.Y., Meltsov I.V., Tikunova N.V. Identification of the etiological agent of equine piroplasmosis in Western and Eastern Siberia. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(2):224–229. DOI 10.18699/VJ18.351 (in Russian)

Пироплазмидоз лошадей – природно-очаговая инфекция, которую вызывают простейшие гемопаразиты отряда Piroplasmida – *Babesia caballi* и *Theileria equi*. Жизненные циклы обоих инфекционных агентов включают чередование бесполого размножения в эритроцитах позвоночных хозяев, полового процесса в кишечнике клещей и спорогонии (образование спорозоидов) в слюнных железах клеща (Homer et al., 2000), однако имеют свои характерные особенности. Так, *B. caballi* непосредственно инфицируют эритроциты, в то время как *T. equi* первоначально размножаются в лимфоцитах и лишь потом в эритроцитах. Кроме того, *B. caballi*, относящиеся к группе истинных бабезий *Babesia sensu stricto*, передаются трансвариально следующему поколению клещей, в то время как для тейлерий данный способ передачи отсутствует (Scoles, Ueti, 2015). Возбудители пироплазмидозов лошадей также существенно различаются морфологически: у *B. caballi* размер внутриэритроцитарных форм составляет 2.5–5.0 мкм, а у *T. equi* – 1.0–2.5 мкм. До появления молекулярных методов морфологические особенности пироплазмид были основным признаком для дифференциальной диагностики разных видов.

Клинические проявления пироплазмидозов лошадей, вызванных как *B. caballi*, так и *T. equi*, схожи между собой. Заболевание может протекать в острой, подострой и хронической формах. При острой форме наблюдаются лихорадка до 40 °С, потеря аппетита, слабость, потеря веса, отек слизистых оболочек, спленомегалия, тромбоцитопения, а также гемолитическая анемия, приводящая к гемоглобинурии и желтухе (Wise et al., 2013). У животных, выздоровевших после острой инфекции, отмечена длительная персистенция возбудителя при отсутствии каких-либо клинических проявлений; при этом они остаются резервуарами инфекции и способны передавать патогены клещам-переносчикам. Уровень длительной паразитемии обычно бывает низким, поэтому инфицированные животные могут быть выявлены преимущественно серологическими или молекулярно-генетическими методами, но не на основании анализа мазков крови (Scoles, Ueti, 2015).

Показано, что природные очаги пироплазмидозов лошадей не могут поддерживаться в отсутствие специфических переносчиков, которыми являются клещи различных видов, относящихся к родам *Dermacentor*, *Hyalomma* и *Rhipi-*

cephalus. Пироплазмидоз лошадей широко распространен в мире, и только несколько стран (Австралия, Канада, Новая Зеландия, Великобритания, Ирландия и Япония) считаются свободными от этой инфекции (Bhoora et al., 2009; Salim et al., 2010; Wise et al., 2013). В эндемичных районах доля инфицированных животных часто бывает высокой и превышает 60 % (Zhang et al., 2017); однако у большинства животных гемопаразиты персистируют без видимых признаков инфекции. В большинстве случаев вспышки заболевания происходят, когда неинфицированные лошади оказываются в эндемичных районах или если животные с персистирующей инфекцией попадают в районы, в которых пироплазмидоз лошадей отсутствует, но имеются специфичные клещи-переносчики (Scoles, Ueti, 2015).

Протозойные паразиты, вызывающие пироплазмидоз лошадей, впервые описаны в начале 20-го века и названы *Piroplasma caballi* и *Piroplasma equi*. Позднее *P. caballi* были переименованы в *Babesia caballi*, а *Piroplasma equi* – сначала в *Nuttallia equi*, затем в *Babesia equi*, и только в 1998 г. таксономическое положение данного возбудителя было окончательно установлено. На основании результатов ультрамикроскопического исследования и молекулярно-генетического анализа *B. equi* в настоящее время отнесены к тейлериям и названы *T. equi* (Mehlhorn, Schein, 1998; Uilenberg, 2006).

В России пироплазмидозы лошадей и их возбудители впервые выявлены в 1906–1908 гг. в Рязанской губернии, в последующие годы пироплазмидозы обнаружены в различных губерниях России. В 1930–1950-х гг. эпизоотическая обстановка по пироплазмидозу резко ухудшилась из-за перемещений большого количества лошадей в эндемичные районы; наблюдался массовый падеж животных. Это послужило причиной для проведения масштабных исследований, посвященных изучению данного заболевания в СССР. В крови лошадей из неблагополучных по пироплазмидозу районов идентифицированы оба возбудителя инфекции, доказана роль клещей *Hyalomma plumbeum*, *H. scupense*, *Rhipicephalus bursa*, *Dermacentor silvarum*, *D. nuttalli* и *D. marginatus* как переносчиков исследуемых гемопаразитов (Марков и др., 1940; Петунов, 1948; Абрамов, 1955; Будник, 1955). В работах советских ученых показано также, что *B. caballi* способны передаваться трансвариально в течение не менее 11 поколений клещей

и что *T. equi* могут передаваться от инфицированных к неинфицированным животным клещами половозрелых стадий в результате прерывистого питания самцов и частой смены хозяев (Будник, 1955). Следует отметить, что в отечественной литературе 1930–1960-х гг. сохранялась старая терминология: инфекционные агенты назывались *P. caballi* и *N. equi*, а вызываемые ими заболевания – пироплазмозом и нутталлиозом.

В 1960-х гг. в связи с уменьшением поголовья лошадей и распашкой целинных земель, приведшими к уменьшению численности клещей, заболеваемость пироплазмидозами существенно снизилась (Христиановский, Беличенко, 2009). Кроме того, для лечения и профилактики пироплазмидозов в эндемичных районах стали широко применять современные противопроtozoйные препараты, такие как азидин, верибен, гемоспоридин, бартизин, бабезан и другие, что позволило снизить заболеваемость этой инфекцией. Тем не менее случаи пироплазмидоза лошадей периодически наблюдали в различных регионах Сибири. В частности, в 2008 г. в Усть-Удинском районе Иркутской области была отмечена вспышка инфекции, которая привела к падежу животных (Федулина и др., 2014). Новосибирская область и Республика Алтай остаются неблагополучными по пироплазмидозу лошадей территориями. В Республике Алтай отмечено увеличение заболеваемости с середины 1990-х гг., при этом случаи пироплазмидоза наблюдались во всех районах региона (Южаков, 2002).

К сожалению, в последние десятилетия исследования пироплазмидозов лошадей в России практически не проводились. Имеются лишь фрагментарные сведения о выявлении данного заболевания, при этом диагноз в большинстве случаев основан только на клинической картине. Информация по генетической идентификации возбудителя пироплазмидоза лошадей из каких-либо регионов России также отсутствует. В предварительных исследованиях нами генотипирован возбудитель пироплазмидоза в шести образцах крови лошадей из г. Иркутска; во всех случаях обнаружена ДНК *T. equi* (Федулина и др., 2014).

Цель настоящей работы – изучение инфицированности лошадей возбудителями пироплазмидоза в отдельных районах Западной и Восточной Сибири; установление видовой принадлежности выявленных возбудителей пироплазмидоза и проведение молекулярно-генетического анализа инфекционных агентов.

Материалы и методы

Собраны образцы крови от 155 лошадей из различных районов Новосибирской, Иркутской областей и Республики Алтай. В Новосибирской области исследуемые лошади содержались в школе верховой езды, конном клубе и частной конюшне; в Иркутской области – в частных конюшнях, фермерских хозяйствах и на ипподроме; в Республике Алтай – в конно-спортивной школе и фермерском хозяйстве (таблица). Образцы крови (по 400 мкл от каждого животного) собирали в стерильные пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой (по 40 мкл 0.5 М раствора ЭДТА) и выделяли ДНК с использованием наборов «Проба НК» (ДНК-технология, Москва), как описано ранее (Рар и др., 2014).

Выделенные образцы ДНК исследованы методом гнездовой двухраундовой ПЦР в присутствии праймеров из области гена 18S рРНК на наличие ДНК бабезий и тейлерий, как описано ранее (Rar et al., 2014). Все реакции амплификации проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 67 мМ Tris-HCl (pH 8.9), 16.6 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 мМ MgCl_2 , 0.01 % Tween-20, 5 % глицерин, 0.02 % крезоловый красный, 200 мкМ дНТФ, 0.5 мкМ праймеров, 2 ед. акт. Taq-ДНК полимеразы и 2 мкл ДНК (для постановки 1-го раунда ПЦР) или 2 мкл ампликона (для постановки 2-го раунда ПЦР). В качестве отрицательного контроля использована бидистиллированная вода, положительным контролем служила ДНК *Babesia microti*, выделенная из собранных в природе клещей *Ixodes persulcatus* (Rar et al., 2014). Для того чтобы исключить возможную контаминацию, выделение ДНК, постановку ПЦР и анализ полученных ампликонов проводили в отдельных комнатах; на всех стадиях использовали одноразовые наконечники с фильтрами. Протокол проведения ПЦР состоял из 35 циклов амплификации, каждый из которых включал стадии денатурации (94 °C, 1 мин), отжига (60 °C, 1 мин) и элонгации (72 °C, 1.5 мин). Для проведения первого раунда ПЦР использовали прямой праймер BS1 (5'-GACGGTAGGGTATTGGCCT-3') и обратный праймер BS2 (5'-ATTCACCGGATCACTCGATC-3'). Второй раунд проводили в виде мультиплексной реакции в присутствии двух прямых праймеров: BS3 (5'-TACCGGGGCGACGACGGGTG-3') и BS5 (5'-CGAGGCAGCAACGGGTAAACG-3') и обратного праймера BS4 (5'-AGGGACGTAGTCGGCACGAG-3'). Праймер BS3 специфичен для тейлерий и бабезий из генетической группы *Babesia microti*, а праймер BS5 – для истинных бабезий *Babesia sensu stricto*.

Полученные продукты ПЦР очищали на колонках GFX Columns (Amersham Biosciences, США). Секвенирующие реакции проводили с использованием набора реагентов BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems Inc., США) в присутствии праймеров BS3, BS4, а также праймера PiroC (5'-CCAACAAAATAGAA CCAARGTCCTAC-3') из внутренней области ампликонов. Продукты секвенирующих реакций анализировали на ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Для сравнения определенных нуклеотидных последовательностей с известными последовательностями использовали программу BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Филогенетический анализ выполняли методом минимальной эволюции (ME) модель Tamura-Nei в пакете программ MEGA 7.0 (<http://www.megasoftware.net/manual.html>). Для анализа статистической значимости проведен bootstrap анализ с 1000 повторов.

Нуклеотидные последовательности фрагмента гена 18S рРНК *T. equi* зарегистрированы в базе данных GenBank под номерами MG551915–MG551921.

Результаты и обсуждение

ДНК *Babesia* spp./*Theileria* spp. обнаружена в образцах крови у 57.9, 38.5 и 65.0 % лошадей из Новосибирской, Иркутской областей и Республики Алтай соответственно (см. таблицу). Нуклеотидные последовательности фрагмента гена 18S рРНК длиной от 329 до 1249 н.п.,

Detection of *Theileria equi* DNA in equine blood samples

Sampling sites		Date of sampling	Number of samples	Number (%) of samples containing DNA of <i>T. equi</i>
Site	Location			
N1	Nov, Krasnoobsk, Riding school	11.2012	9	6 (67)
N2	Nov, Iskitim, Horse Club	04.2014	4	3 (75)
N3	Nov, Razdol'noe, private stable	04.2014	6	2 (33)
Subtotal N1–N3			19	11 (57.9)
Ir1	Irk, Ust'-Udin district, Mol'ka Village, private farm	10.2013	30	5 (17)
Ir2	Irk, Bohan district, Tikhonovka Village, private stable	10.2013	8	6 (75)
Ir3	Irk, Bohan district, Vershina Village, private stable	10.2013	8	4 (50)
Ir4	Irk, Bohan district, Dunkai Village, private stable	10.2013	2	1 (50)
Ir5	Irk, Bohan district, Novaya Ida Village, private stable	10.2013	2	0
Ir6	Irk, Osin district, Ulei Village, private stable	10.2013	20	5 (25)
Ir7	Irk, Irkutsk, Hippodrome	05.2014	26	16 (62)
Subtotal Ir1–Ir7			96	37 (38.6)
A1	Alt, Gorno-Altaysk, Equestrian School	09.2016	20	9 (45)
A2	Alt, Ulagan district, Kara-Kudyur Village, private farm	09.2016	20	17 (85)
Subtotal A1–A2			40	26 (65.0)
Total			155	74 (47.7)

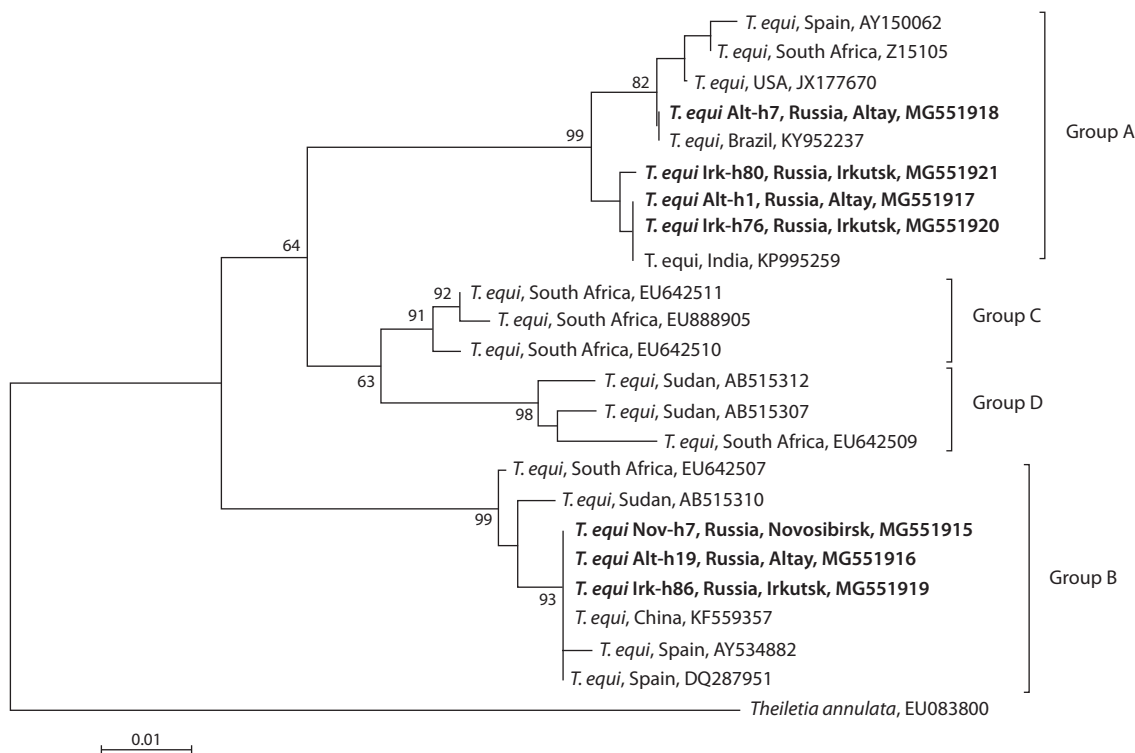
Abbreviations: Nov, Novosibirsk Oblast; Irk, Irkutsk Oblast; Alt, Republic of Altay.

определенные для всех положительных образцов, соответствовали последовательностям *T. equi*. Следует отметить, что ДНК *T. equi* обнаружена в образцах крови из практически всех населенных пунктов, включенных в нашу работу, что свидетельствует о том, что большинство исследованных мест эндемичны по тейлерии лошадей. В весенне-летний период значительная часть лошадей находилась на выпасах, расположенных в ареале различных видов клещей. В Новосибирской области предполагаемые места выпасов лошадей представляют собой лесные и лесостепные биотопы, в которых обитают клещи *Ixodes persulcatus* и *Dermacentor reticulatus*. В Иркутской области участки И1 и И2 – луговые и степные биотопы, в которых доминируют клещи *D. nuttalli*, а окрестности участков И3–И6 находятся в зоне таежных и подтаежных лесов, в которых преобладают *I. persulcatus*, но также встречаются *D. nuttalli* и *D. silvarum*. Лошади из участка И7 (ипподром) выезжали на соревнования в разные районы области, где также имели контакты с клещами. В Республике Алтай окрестности г. Горно-Алтайска (участок А1) представлены лесными и луговыми биотопами, в которых обитают клещи *I. persulcatus* и *D. reticulatus*, а в Улаганском районе (участок А2) выпасы проводят в межгорных степных котловинах, расположенных в ареале клещей *D. nuttalli*. Таким образом, во всех исследованных участках лошади могли во время выпаса иметь контакты с клещами рода *Dermacentor* – специфичными переносчиками *T. equi*. Интересно, что восемь лошадей из конно-спортивной школы г. Горно-Алтайска не были на выпасах в 2016 г., и ни у одной из них в крови не выявлены тейлерии, в то время как среди остальных лошадей тейлерии обнаружены у 75 %.

Следует отметить, что *B. caballi* не обнаружена ни в одном из исследованных образцов, несмотря на то что в 1930–1950-х гг. данный возбудитель выявлялся в большинстве неблагополучных по пироплазмидозу районов, в том числе на Алтае и в Забайкалье (Овчинников и др., 1941; Семенов, 1955). Причина исчезновения *B. caballi* остается непонятной, поскольку *B. caballi* с высокой эффективностью передаются трансвариально и должны сохраняться в популяции клещей даже при отсутствии инфицированных животных. Более широкие исследования необходимы для выяснения эпизоотической обстановки по бабезиозу на территории Западной и Восточной Сибири.

По сравнению с другими представителями рода *Theileria*, *T. equi* является наиболее варибельным видом. На основании анализа гена 18S рРНК известные изоляты *T. equi* отнесены к четырем генетическим группам (А–D), существенно различающимся между собой по последовательностям варибельной (V4) области гена (Bhoora et al., 2009; Salim et al., 2010). Анализ определенных в настоящей работе нуклеотидных последовательностей показал, что большинство (65 из 74) образцов *T. equi* относится к группе В, а девять образцов – к группе А (рисунок). Следует отметить, что *T. equi* группы В обнаружены во всех исследованных участках, а *T. equi* группы А – только в окрестностях г. Горно-Алтайска (участок А1) и в Боханском районе Иркутской области (участки И2–И4).

Все определенные последовательности *T. equi* группы В идентичны между собой и соответствовали таковым, выявленным в крови лошадей из различных стран: Китая (KF559357), Кореи (HM229407), Монголии (AB733379), Швейцарии (KM046918) и Испании (DQ287951). Тейлерии этой генетической группы обнаружены также на



Dendrogram of the similarity between nucleotide sequences (329 bp) of the 18S rRNA fragment of *T. equi* constructed by the ME method. The scale bar corresponds to 1% divergence. Sequences obtained in this study are shown in boldface.

территории Африки (AB515310, EU642507 и др.). Последовательности *T. equi* группы А более вариабельны и различались между собой одной-пятью нуклеотидными заменами. Последовательность одного образца из Горно-Алтайска (Alt-h7) была идентична последовательности *T. equi* из Бразилии (KY952237), остальные последовательности группы А (Irk-h80, Alt-h1, Irk-h-76) соответствовали последовательности, выявленной в крови лошади из Индии (KP995259), или отличались от нее единичными заменами (см. рисунок). Следует отметить, что тейлерии, относящиеся к генетической группе А, обнаружены также в других регионах: Европе (AY150062), США (JX177670) и Южной Африке (Z15105).

Таким образом, в настоящем исследовании впервые генетически подтверждено наличие этиологического агента пироплазмидоза в образцах крови лошадей на территории России. ДНК *T. equi* обнаружена в образцах крови лошадей из всех исследованных участков Новосибирской и Иркутской областей, а также Республики Алтай. Доля инфицированных лошадей в разных областях составляла 42.6–65.0 %. Выявленные образцы *T. equi* на основании анализа гена 18S рРНК относились к двум из четырех известных генетических групп *T. equi* – группам А и В, обнаруживаемым на различных континентах.

Acknowledgments

Analysis of samples from the Novosibirsk oblast was supported by the Russian Science Foundation, project 15-14-20020. Analysis of samples from Altay was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 16-

44-040043. Analysis of samples from the Irkutsk oblast was supported by the Program of Academic Research in State Academies of Sciences, project 0309-2016-0002.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Abramov I.V. On the longevity of the causative agent of equine piroplasmosis (*Piroplasma caballi*) in ticks *Hyalomma plumbeum* Panzer, 1795. Veterinariya = Veterinary. 1955;3:42-46. (in Russian)
- Bhoora R., Franssen L., Oosthuizen M.C., Guthrie A.J., Zweygarth E., Penzhorn B.L., Jongejan F., Collins N.E. Sequence heterogeneity in the 18S rRNA gene within *Theileria equi* and *Babesia caballi* from horses in South Africa. Vet. Parasitol. 2009;159(2):112-120. DOI 10.1016/j.vetpar.2008.10.004.
- Budnik V.S. New data on the mechanism of transmission of the causative agent of equine nuttalliosis by pasture ticks (*Dermacentor marginatus* Sulz). Veterinariya = Veterinary. 1955;8:36-43. (in Russian)
- Fedulina O.O., Rar V.A., Suntsova O.V., Kozlova I.V. Identification of *Theileria equi* in horse blood in Irkutsk oblast. Byulleten VSNTs SO RAMN = Bulletin of the East Siberian Scientific Center SBRAMS. 2014;6:101-104. (in Russian)
- Homer M.J., Aguilar-Delfin I., Telford III S.R., Krause P.J., Persing D.H. Babesiosis. Clin. Microbiol. Rev. 2000;13(3):451-469.
- Khristianovsky P.I., Belichenko V.V. Piroplasmoses of animals on Southern Ural. Rossiyskiy parazitologicheskiy zhurnal = Russian Parasitological Journal. 2009;2:70-74. (in Russian)
- Markov A.A., Kurchatov V.N., Dzasokhov G.S. The role of *Rhipicephalus bursa* ticks in the spreading of equine nuttalliosis. Veterinariya = Veterinary. 1940;1:33. (in Russian)
- Mehlhorn H., Schein E. Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi*. Parasitol. Res. 1998;84(6):467-475.

- Ovchinnikov P.A., Nikitenko G.I., Zhiltsov P.A., Zabelin V.A. *Derma-centor nuttalli* ticks as a vector of equine piroplasmosis and nuttalliosis. Veterinariya = Veterinary. 1941;2:15-16. (in Russian)
- Petunin F.A. *Hyalomma scupense* P. Sch. tick is a vector of equine nuttalliosis. Veterinariya = Veterinary. 1948;9:14. (in Russian)
- Rar V.A., Epikhina T.I., Suntsova O.V., Kozlova I.V., Lisak O.V., Pukhovskaya N.M., Vysochina N.P., Ivanov L.I., Tikunova N.V. Genetic variability of *Babesia* parasites in *Haemaphysalis* spp. and *Ixodes persulcatus* ticks in the Baikal region and Far East of Russia. Infect. Genet. Evol. 2014;28:270-275. DOI 10.1016/j.meegid.2014.10.010.
- Rar V.A., Epikhina T.I., Tikunova N.V., Bondarenko E.I., Ivanov M.K., Yakimenko V.V., Malkova M.G., Tantsev A.K. DNA detection of pathogens transmitted by Ixodidae ticks in blood of small mammals inhabiting the forest biotopes in the Middle Irtysh region (Omsk oblast, West Siberia). Parazitologiya = Parasitology. 2014;48(1):37-53. (in Russian)
- Salim B., Bakheit M.A., Kamau J., Nakamura I., Sugimoto C. Nucleotide sequence heterogeneity in the small subunit ribosomal RNA gene within *Theileria equi* from horses in Sudan. Parasitol. Res. 2010;106(2):493-498. DOI 10.1007/s00436-009-1691-7.
- Scoles G.A., Ueti M.W. Vector ecology of equine piroplasmosis. Annu. Rev. Entomol. 2015;60:561-580. DOI 10.1146/annurev-ento-010814-021110.
- Semenov P.V. Distribution of ixodid ticks and equine hemosporodioses in Altai kray. Sbornik nauchnykh rabot Altayskoy nauchno-issledovatel'skoy veterinarnoy stantsii [Collection of scientific works of the Altai SRVS]. 1955;1:245-262. (in Russian)
- Uilenberg G. *Babesia* – a historical overview. Vet. Parasitol. 2006;138:3-10.
- Wise L.N., Kappmeyer L.S., Mealey R.H., Knowles D.P. Review of equine piroplasmosis. J. Vet. Intern. Med. 2013;27(6):1334-1346.
- Yuzhakov A.Yu. Epizootology of equine piroplasmosis in the Republic of Altai. Tezisy докладov nauchnoy konferentsii "Aktualnye voprosy biologii, ekologii i veterinarnoy meditsiny domashnikh zhivotnykh" [Abstracts from the scientific conference "Current problems in biology, ecology and veterinary medicine of domestic animals"]. Tyumen, 2012;142-144 (in Russian)
- Zhang Y., Chahan B., Liu S., Song R., Li Y., Huercha, Guo Q., Wu H., Zhu Y. Epidemiologic studies on *Theileria equi* infections for grazing horses in Ili of Xinjiang province. Vet. Parasitol. 2017;244:111-113.

Исследование экспрессии генов рецептора глюкокортикоидов и микроРНК в гиппокампе и концентрации кортизола в крови у лисиц, селекционируемых по реакции на человека

В.Ю. Овчинников, Е.В. Антонов, Г.В. Васильев, С.Г. Шихевич, Д.В. Шепелева, Ю.Э. Гербек

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Стресс-реакция во многих случаях является одной из причин формирования агрессивного поведения как у животных, так и у человека. Ослабление стресс-ответа, по-видимому, существенно снижает агрессию по отношению к человеку у domesticированных животных. Однако механизмы этого снижения по-прежнему остаются далеко не ясны. В настоящей работе на экспериментальной модели доместикации, серебристо-черной лисице (*Vulpes vulpes*), полученной путем многолетнего отбора на реакцию к человеку, изучен ответ на стресс по уровню кортизола в крови у domesticируемых и агрессивных лисиц, вызванный 15-минутным удержанием на руках человека. Кроме того, у животных из этих поведенческих групп исследован один из важных механизмов глюкокортикоидной отрицательной обратной связи – экспрессия гена рецептора глюкокортикоидов (*NR3C1*) в гиппокампе. В работах последних лет существенное внимание уделяется различиям в профиле экспрессии микроРНК у животных с разным поведением и стресс-реакцией, а также микроРНК-регуляции экспрессии генов при стрессе, в том числе *NR3C1*. В этой работе проведен miRNA-seq анализ образцов участка дорзального гиппокампа. Показано, что удержание на руках человека вызывает глюкокортикоидный стресс-ответ как у domesticируемых, так и у агрессивных лисиц. При этом у агрессивных животных стресс-индуцированный уровень кортизола был достоверно выше по сравнению с domesticируемыми. В то же время различий экспрессии гена *NR3C1* в дорзальном гиппокампе и профиле экспрессии микроРНК не обнаружено. Таким образом, снижение стресс-ответа при отборе лисиц на отсутствие агрессивной и проявление эмоционально-положительной реакции к человеку, по-видимому, не связано с такими важными механизмами регуляции, как изменение экспрессии гена *NR3C1* и микроРНК-регуляция.

Ключевые слова: доместикация; кортизол; ручные лисицы; *NR3C1*; микроРНК.

Hippocampal glucocorticoid receptor and microRNA gene expression and serum cortisol concentration in foxes selected for behavior toward humans

V.Yu. Ovchinnikov, E.V. Antonov, G.V. Vasilyev, S.G. Shihevich, D.V. Shepeleva, Yu.E. Herbeck

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

In many cases, stress reactivity is one of the important bases of aggressive behavior. It appears as if reduced stress reactivity underlies an abrupt decrease in aggression towards man in domesticated animals. However, the mechanisms of this reduction have yet to be resolved. In this work, we used an experimental domestication model, the silver fox selected for many years for the response to humans to study cortisol stress reactivity in tame and aggressive foxes in response to immobilization in human arms. Additionally, these behavioral fox groups were explored for one of the important mechanisms of glucocorticoid negative feedback, the expression of the glucocorticoid receptor gene (*NR3C1*) in a portion of the dorsal hippocampus. In recent years, attention has been paid to differences in miRNA expression patterns between animals with different behavior and stress reactivity, as well as to miRNA regulation under stress. The same applies to *NR3C1* mRNA as well. That is why we performed a miRNA-seq analysis on a portion of the fox dorsal hippocampus. It has been demonstrated that immobilization in human arms leads to significantly higher stress-induced cortisol levels in aggressive than tame foxes. At the same time, no differences have been found between hippocampal *NR3C1* gene expression and the pattern of miRNA expression. Thus, reduced stress reactivity in foxes during selection for the absence of aggressive responses and for the presence of emotionally positive responses to humans does not seem to be associated with important mechanisms of regulation such as alterations in hippocampal *NR3C1* gene expression or microRNA-mediated silencing.

Key words: domestication; cortisol; tame foxes; *NR3C1*; miRNA.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Овчинников В.Ю., Антонов Е.В., Васильев Г.В., Шихевич С.Г., Шепелева Д.В., Гербек Ю.Э. Исследование экспрессии генов рецептора глюкокортикоидов и микроРНК в гиппокампе и концентрации кортизола в крови у лисиц, селекционируемых по реакции на человека. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(2):230-234. DOI 10.18699/VJ18.352

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Ovchinnikov V.Yu., Antonov E.V., Vasilyev G.V., Shihevich S.G., Shepeleva D.V., Herbeck Yu.E. Hippocampal glucocorticoid receptor and microRNA gene expression and serum cortisol concentration in foxes selected for behavior toward humans. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(2):230-234. DOI 10.18699/VJ18.352 (in Russian)

В исследованиях последнего десятилетия показана важная роль микроРНК в регуляции нейральных функций. В частности, они участвуют в регуляции поведения (тревожности/страха), обучении, формировании памяти. Роль микроРНК в регуляции стресс-ответа также широко изучается в последнее время (Hollins, Cairns, 2016). Это относится и к генетически закрепленным различиям в поведении и стресс-ответе. Например, линии крыс, селекционированных на высокую (bHR) и низкую (bLR) активность в новых условиях, у которых различны уровни стресс-реакции, агрессивности и других поведенческих реакций, имеют также различия в паттерне экспрессии микроРНК как в покое, так и после стресса в разных структурах мозга (Hamilton et al., 2014). Есть работы и на других видах, в том числе собаках разных пород, имеющих различные характеристики по толерантности к стрессу (Luo et al., 2016). В исследованиях на человеке выявлена ассоциация однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) в последовательностях микроРНК с агрессивным поведением и возникновением заболеваний ЦНС (Hollins, Cairns, 2016).

Для изучения регуляции стресс-ответа одной из наиболее важных структур мозга является гиппокамп, осуществляющий глюкокортикоидную отрицательную обратную связь, купирующую стресс. В настоящее время известно большое количество микроРНК, изменяющих свою экспрессию в гиппокампе под воздействием стрессорных факторов различной природы и продолжительности – от острого до хронического и пренатального стресса. Многие из этих микроРНК участвуют и в других нервных процессах (Hollins, Cairns, 2016).

Важным для понимания природы таких форм поведения, как агрессия, ручное поведение, тревожность/страх, является изучение процессов доместикации животных. Историческая доместикация коренным образом изменила поведение животных. Вероятно, основой этого было ослабление стресс-ответа, благодаря чему человек перестал вызывать стресс у животных (Беляев, 1981; Coppinger R., Coppinger L., 2002). В данной работе использовали экспериментальную модель доместикации, созданную на лисицах в Институте цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск) путем длительной селекции против агрессии и по усилению эмоционально-положительного ответа по отношению к человеку. Ранее у доместизируемых лисиц было показано снижение глюкокортикоидного стресс-ответа и базального уровня глюкокортикоидов в крови (Беляев и др., 1971; Оськина и др., 2008), а также ослабление активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС) в других звеньях. Более быстрое возвращение кортизола к базальному уровню после стресса указывает на усиление глюкокортикоидной отрицательной обратной связи у доместизируемых лисиц (Trut et al., 2009). Это может быть связано с повышенной экспрессией гена рецепторов глюкокортикоидов (*NR3C1*) в гиппокампе, отношением количеств рецепторов глюкокортикоидов и минералокортикоидов (*NR3C1/NR3C2*), сниженным *CRHR1* в гипоталамусе и рядом других генов (Weaver et al., 2004; de Kloet et al., 2017; Dow-Edwards, Silva, 1917). Из литературы известно, что изменение экспрессии этих генов во время стресс-ответа может быть обусловлено с

микроРНК-регуляцией (Jung et al., 2015; Hollins, Cairns, 2016). В частности, показано, что *miR-124* изменяет свою экспрессию в гиппокампе грызунов при длительном стрессе и депрессии (Meerson et al., 2010; Wang et al., 2017), при этом мРНК *NR3C1* является ее мишенью (Wang et al., 2017). Для исследования возможного участия микроРНК в формировании доместикационного поведения и снижении стресс-ответа у доместизируемых лисиц в первую очередь нужно изучить различия в уровне микроРНК в покое. Так, укрепление глюкокортикоидной отрицательной обратной связи и снижение стресс-ответа у взрослых крыс, подвергавшихся неонатальному хэндлингу, и у потомков матерей, активно заботящихся о детенышах, ассоциировано именно с повышенной экспрессией гена *NR3C1* в гиппокампе в покое. Причем показана прямая связь количества мРНК с количеством белка *Nr3c1* (Liu et al., 1997; Weaver et al., 2004).

Целью данного исследования было изучение базальной экспрессии гена рецептора глюкокортикоидов и профиля экспрессии микроРНК в дорзальном гиппокампе лисиц в зависимости от поведения по отношению к человеку и активности ГГНС.

Проведен анализ базального количества мРНК *NR3C1* методом ОТ-ПЦР в реальном времени и профиля экспрессии с помощью метода *miRNA-seq* в участке дорзального гиппокампа, а также базального и стрессорного уровня кортизола в ответ на 15-минутное удержание животного на руках человека, с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Материалы и методы

Экспериментальные животные. Лисицы селекционированы и содержатся в ЦКП «Генофонды пушных и сельскохозяйственных животных» ИЦиГ СО РАН (Новосибирск). Доместизируемые лисицы получены путем длительной селекции на эмоционально-положительную реакцию на человека, а агрессивные – на усиление агрессивной реакции (Trut et al., 2009). Образцы крови взяты у шестимесячных самцов перед удержанием на руках человека в течение 15 мин и сразу после этого воздействия. Лисиц умерщвляли путем введения 5.0 % раствора тиопентала натрия. Фрагменты дорзального гиппокампа взяты у семимесячных самцов. Эксперименты проводили в соответствии с международными европейскими биотическими стандартами (директива 2010/63/EU).

Хроматографический анализ. Содержание кортизола в сыворотке крови определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (хроматограф Agilent 1200 Series LC) с применением диодноматричного детектора. Для концентрирования образцов использовали жидкостную экстракцию дихлорэтаном. Элюирование проводили в изократическом режиме – 30 % ацетонитриле в воде со скоростью подачи элюента 1 мл/мин. Для количественного анализа выбрана длина волны 246 нм. Хроматографическое разделение выполняли на колонке ZORBAX C18 2 × 150 мм (5 мкм). Концентрации вычисляли по внутреннему стандарту (дексаметазон). Следует отметить, что процедура забора образцов крови или умерщвления для взятия образцов мозга у лисиц занимает 5 мин. За это время уровень кортизола уже успевает под-

няться достоверно, хотя и на малую величину (Беляев и др., 1971). Поэтому базальный уровень нельзя считать таковым в полной мере.

Выделение суммарной РНК и ОТ-ПЦР в реальном времени. Суммарную РНК выделяли с помощью TRIzol™ Reagent (Invitrogen, США) ($n = 5$ животных в каждой группе). Удаление геномной ДНК проводили с использованием фермента ДНКазы I, свободного от рибонуклеаз (Thermo Fisher Scientific, США). кДНК синтезировали в реакционной смеси объемом 20 мкл, включающей 0.2 мкг суммарной РНК, обратную транскриптазу RevertAid (Thermo Fisher Scientific, США) и праймер полиТ(15) (Биоссет, Россия). ПЦР в реальном времени (денатурация ДНК 95 °C 5 мин и 40 циклов амплификации: 95 °C 30 с, 60 °C 20 с и 72 °C и 20 с) проводили на приборе ViiA7 Real-Time PCR System (Life Technologies) с применением реакционной смеси Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, США). Последовательности праймеров к генам *NR3C1* (F: 5'-ACTGCTTCTCTCTTC AGTTCC-3'; R: 5'-AGTTCTGGCTGGAGTTCCC-3') и *CANX* (референсный ген; F: 5'-GATGCCCCCTGCTA AGATTCC-3'; R: 5'-CTTCATCCCAATCCTCTGGC-3') подобраны при посредстве данных транскриптома лисицы (Kukekova et al., 2011). Специфичность продуктов ПЦР определяли с помощью секвенирования по Сенгеру (ЦКП «Геномика» СО РАН), анализа кривых плавления и гель-электрофореза. Все ПЦР выполнены в тройных технических повторях. Оценку количества мРНК проводили путем анализа значений пороговых циклов C_t с помощью модифицированного метода $\Delta\Delta C_t$ с применением программы GenEx 5.4.1 (MultiD, Швеция). Эффективность реакции определяли серией разведений кДНК.

Секвенирование микроРНК. Фракции малой РНК выделены из препаратов тотальной РНК с помощью mirVana kit (Thermo Fisher Scientific, США). Качество и доля микроРНК в составе фракции малых РНК определены на биоанализаторе BA2100 набором Small RNA Kit (Agilent). Баркодированные библиотеки для секвенирования сконструированы благодаря использованию TruSeq Small RNA Library Preparation Kit (Illumina) в соответствии с протоколом изготовителя. Количество взятого в реакцию материала рассчитано так, чтобы доля фракции микроРНК (зона 20–40 нт) составляла 80 нг. Для амплификации использовано 11 циклов ПЦР. Финальную очистку проводили набором AMPure XP (Agencourt). Из полученных библиотек дополнительно выделена фракция 145–160 нт, содержащая последовательности микроРНК, с помощью LabChip XT (Caliper Life Sciences). Качество полученных библиотек и их молярность определены на биоанализаторе BA2100 набором DNA High Sensitivity. Все библиотеки отсекушены на приборе NextSeq 550 (Illumina) с длиной чтения 36 п. н.

Биоинформатический анализ. Результаты секвенирования отфильтрованы по качеству, с дальнейшим удалением последовательности адаптера и отбором по длине (в анализе остались последовательности с длиной 18–26 нуклеотидов). Геномная последовательность лисицы для предсказания микроРНК представлена в (Kukekova et al., unpublished). При использовании генома, программы miRCandRef (Fromm et al., 2013) и набора критериев мик-

роРНК (Fromm et al., 2015) были предсказаны микроРНК-кандидаты. Для удаления транскрибируемых геномных повторов и других РНК, кроме микроРНК, результаты предсказания были прокартированы программой Bowtie (Langmead, 2010) на последовательности из базы данных Rfam (12.3), кроме последовательностей микроРНК, на набор РНК собаки, полученный из баз данных RefSeq (Release 83) и GeneBank (Release 220), и на геном лисы, обработанный программой RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org/>). Далее мы определяли консервативные микроРНК среди некартированных последовательностей с помощью программы BLAST и набора микроРНК *Canis lupus familiaris* из базы данных miRBase (<http://mirbase.org/>).

Статистическая обработка результатов. При определении количества кортизола в крови применяли двухфакторный дисперсионный анализ с дальнейшим попарным сравнением с применением t -теста Стьюдента. Для попарного сравнения данных относительной экспрессии гена *NR3C1* и микроРНК в гиппокампе использовали критерий Манна–Уитни (U). Результаты представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. Для всех случаев величина $p < 0.05$ считалась статистически значимой.

Результаты

Анализ количества кортизола в сыворотке крови в ответ на стресс. Двухфакторный дисперсионный анализ выявил эффект генотипа ($F_{1,37} = 26.01, p < 0.001$) и эффект стресса на уровень кортизола ($F_{1,37} = 64.5; p < 0.001$). Взаимодействие фактора генотипа и фактора стресса также достоверно ($F_{1,37} = 6.23; p < 0.001$). Базальный уровень кортизола в сыворотке крови у domesticируемых лисиц был ниже, чем у агрессивных (рис. 1; $p < 0.05$). Повышение уровня кортизола в крови достоверно не зависело от генотипа ($p < 0.001$). У domesticируемых лисиц рост уровня кортизола был достоверно ниже, чем у агрессивных (см. рис. 1; $p < 0.001$).

Анализ экспрессии гена *NR3C1* в участке дорзального гиппокампа. Уровень экспрессии гена *NR3C1* в участке дорзального гиппокампа сравнивали у domesticируемых и агрессивных лисиц с использованием метода ОТ-ПЦР в реальном времени. Однако анализ полученных данных не выявил достоверных различий между группами (рис. 2; $p > 0.05$).

Биоинформатический анализ микроРНК. Обнаружено 319 консервативных микроРНК (163 семейства) и 9 новых микроРНК (Приложение 1¹) в гиппокампе лисицы. Но достоверных различий в экспрессии между группами не выявлено ($p > 0.05$).

Обсуждение

Полученные результаты показали, что удержание на руках человека является стрессом не только для агрессивных, но и для domesticируемых лисиц, причем группы достоверно различаются как по базальному, так и по стресс-индуцированному уровню кортизола. Это подтверждает данные, полученные на предыдущих поколениях селекции (Трут и др., 1972; Trut et al., 2009).

¹ Приложения 1 и 2 см. по адресу:
<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2018-22/appx5.pdf>

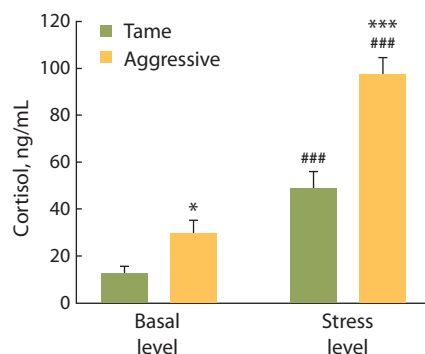


Fig. 1. Serum cortisol concentrations in tame and aggressive silver foxes before ("Basal level") and immediately after ("Stress level") 15-min immobilization in human arms, ng/mL.

* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ in comparison with tame foxes at the same time since the beginning of the stress, ### $p < 0.001$ in comparison with the basal level.

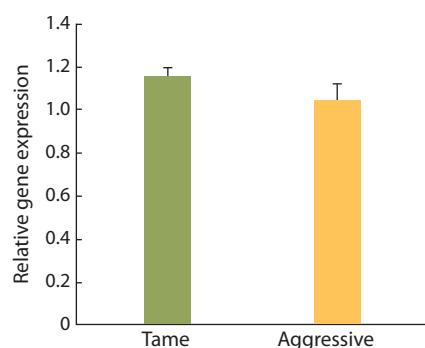


Fig. 2. Relative amounts of dorsal hippocampal *NR3C1* mRNA in tame and aggressive foxes.

В настоящей работе использован дополнительный стрессор – человек, на различное поведение к которому и селекционировали лисиц. В более ранних работах в качестве ограничения движения использовали рестриктор (Попова и др., 1980; Оськина и др., 2008). На другой экспериментальной модели доместикации, серой крысе, обнаружен сниженный уровень базального и стресс-индуцированного кортикостерона (Дыгало и др., 1985; Plyusnina, Oskina, 1997), что свидетельствует о ключевой роли снижения стресс-ответа (Беляев, 1981; Coppinger R., Coppinger L., 2002). Однако более поздние поколения ручных и агрессивных крыс уже не имели достоверных отличий в уровне кортикостерона за счет снижения стресс-реактивности у агрессивных животных.

При этом уровень агрессии сохранялся прежним (Прасолова и др., 2014). Тем не менее следует учитывать, что на крысах до сих пор не проведен эксперимент, где в качестве стрессора выступал бы человек.

Несмотря на различия в количестве мРНК *NR3C1* и его белка у ручных и агрессивных крыс в гиппокампе (Оськина и др., 2008; Гербек и др., 2010), аналогичных различий в количестве мРНК этого гена в гиппокампе лисиц в данном исследовании не обнаружено. Возможно, у domesticated silver foxes пониженный стресс-ответ и его более быстрое купирование (Оськина и др., 2008) осуществляются с помощью других механизмов отрицательной обратной связи, например изменения соотношения *NR3C1*/*NR3C2* в гипоталамусе или эндоканнабиноидной системы.

При анализе микроРНК в участке дорзального гиппокампа мы выявили 319 консервативных микроРНК (163 семейства) и 9 новых микроРНК (Приложение 1). Следует отметить, что последовательности предшественников ортологичных микроРНК собаки и лисы в основном идентичны. Мы ожидали увидеть разницу в уровнях экспрессии микроРНК в гиппокампе у двух групп лисиц, отличающихся по стресс-ответу, агрессии и тревожности, так как микроРНК-регуляция затрагивает ряд генов, участвующих в этих реакциях в разных структурах мозга (Hamilton et al., 2014; Hollins, Cairns, 2016). Исследование базального уровня микроРНК у двунаправленно селекционируемых групп крыс (bHR и bLR), отличающихся по подобным же признакам, показало достоверные различия между группами в *nucleus accumbens* и *prelimbic cortex*. D.E. Hamilton с коллегами предполагают наличие подобных различий в профиле микроРНК также в гиппокампе и миндалине (Hamilton et al., 2014). Однако в нашем исследовании не выявлено значимой разницы в экспрессии не только у микроРНК, ортологи которой, по данным литературы, изменяют экспрессию при разных формах стресса (Hollins, Cairns, 2016) (Приложение 2), но и у остальных обнаруженных микроРНК.

Таким образом, ни количество *NR3C1* мРНК, ни профиль микроРНК достоверно не различаются в гиппокампе, ключевой площадке регуляции стресс-ответа, несмотря на достоверные различия в базальном и стресс-индуцированном уровне кортизола. По-видимому, отбор на разные формы поведения не повлиял на уровень экспрессии гена рецептора глюкокортикоидов и на профиль экспрессии микроРНК в дорзальном гиппокампе, а связанные с этим видом отбора изменения в стресс-реактивности обусловлены изменениями в других ветвях регуляции функционирования ГГНС.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Science Foundation, project 16-14-10216. The infrastructure of the study was supported by State Budgeted Project 0324-2018-0016.

The authors acknowledge the help of Cand. Sci. (Biol.) A.V. Kharlamova and to A.V. Vladimirova, I.V. Pivovarova, T.I. Semenova, and the staff of the Shared Access Center "Gene Pools of Fur and Farm Animals", Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk. miRNA sequencing was conducted at the Shared Access Center for Genomic Studies, Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Belyaev D.K. Destabilizing selection as a factor in domestication. *Genetika i blagosostoyanie chelovechestva* [Genetics and Animal Well-Being]. Moscow: Nauka Publ., 1981;53-66. (in Russian)
- Belyaev D.K., Naumenko E.V., Trut L.N., Korshunov E.A. Function of the adrenal cortex and its seasonal changes in silver foxes. *Doklady AN SSSR = Proceedings of the Academy of Sciences of the USSR*. 1971;200(5):1249-1251. (in Russian)
- Coppinger R., Coppinger L. *Dogs: a New Understanding of Canine Origin, Behavior and Evolution*. Chicago, 2002.
- de Kloet E.R., Ortiz Z., Meijer O.C. Manipulating the brain corticosteroid receptor balance: focus on ligands and modulators. *Stress: Neuroendocrinology and Neurobiology*. 2017;367-383.

- Dow-Edwards D., Silva L. Endocannabinoids in brain plasticity: Cortical maturation, HPA axis function and behavior. *Brain Res.* 2017; 1654:157-164. DOI 10.1016/j.brainres.2016.08.037.
- Dygalov N.N., Shishkina G.T., Borodin P.M., Naumenko E.V. Role of the brain neurochemical systems in altering the reactivity of the hypothalamic-adrenal system in the gray rat selected for behavior. *Zhurnal evolyutsionnoy biokhimii i fiziologii = Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology.* 1985;21(4):342-347. (in Russian)
- Fromm B., Billipp T., Peck L.E., Johansen M., Tarver J.E., King B.L., Newcomb J.M., Sempere L.F., Flatmark K., Hovig E., Peterson K.J. A uniform system for the annotation of vertebrate microRNA genes and the evolution of the human microRNAome. *Annu. Rev. Genet.* 2015;49:213-242. DOI 10.1146/annurev-genet-120213-092023.
- Fromm B., Worren M.M., Hahn C., Hovig E., Bachmann L. Substantial loss of conserved and gain of novel microRNA families in flatworms. *Mol. Biol. Evol.* 2013;30:2619-2628. DOI 10.1093/molbev/mst155.
- Hamilton D.E., Cooke C.L., Carter B.S., Akil H., Watson S.J., Thompson R.C. Basal microRNA expression patterns in reward circuitry of selectively bred high-responder and low-responder rats vary by brain region and genotype. *Physiol. Genomics.* 2014;46:290-301. DOI 10.1152/physiolgenomics.00152.2013.
- Herbeck Y.E., Oskina I.N., Gulevich R.G., Plyusnina I.Z. Effects of maternal methyl-supplement diet on hippocampal glucocorticoid receptor mRNA expression in rats selected for behavior. *Cytology and Genetics.* 2010;44:108-113. DOI 10.3103/S0095452710020064.
- Hollins S.L., Cairns M.J. MicroRNA: Small RNA mediators of the brains genomic response to environmental stress. *Prog. Neurobiol.* 2016;143:61-81. DOI 10.1016/j.pneurobio.2016.06.005.
- Jung S.H., Wang Y., Kim T., Tarr A., Reader B., Powell N., Sheridan J.F. Molecular mechanisms of repeated social defeat-induced glucocorticoid resistance: Role of microRNA. *Brain Behav. Immun.* 2015;44:195-206. DOI 10.1016/j.bbi.2014.09.015.
- Kukekova A.V., Johnson J.L., Teiling C., Li L., Oskina I.N., Kharlamova A.V., Gulevich R.G., Padte R., Dubreuil M.M., Vladimirova A.V., Shepeleva D.V., Shikhevich S.G., Sun Q., Ponnala L., Temnykh S.V., Trut L.N., Acland G.M. Sequence comparison of prefrontal cortical brain transcriptome from a tame and an aggressive silver fox (*Vulpes vulpes*). *BMC Genomics.* 2011;12. DOI 10.1186/1471-2164-12-482.
- Langmead B. Aligning short sequencing reads with Bowtie. *Curr. Protoc. Bioinform.* 2010;32:11.7.1-11.7.14. DOI 10.1002/0471250953.bi1107s32.
- Liu D., Diorio J., Tannenbaum B., Caldji C., Francis D., Freedman A., Sharma S., Pearson D., Plotsky P.M., Meaney M.J. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science.* 1997;277:1659-1662. DOI 10.1126/science.277.5332.1659.
- Luo W., Fang M., Xu H., Xing H., Fu J., Nie Q. Comparison of miRNA expression profiles in pituitary-adrenal axis between Beagle and Chinese Field dogs after chronic stress exposure. *PeerJ.* 2016;4:e1682. DOI 10.7717/peerj.1682.
- Meerson A., Cacheaux L., Goossens K.A., Sapolsky R.M., Soreq H., Kaufer D. Changes in brain MicroRNAs contribute to cholinergic stress reactions. *J. Mol. Neurosci.* 2010;40:47-55. DOI 10.1007/s12031-009-9252-1.
- Oskina I.N., Herbeck Yu.E., Shikhevich S.G., Plyusnina I.Z., Gulevich R.G. Alterations in the hypothalamus-pituitary-adrenal and immune systems during selection of animals for tame behavior. *Informatsionnyy vestnik VOGiS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeders.* 2008;12(1/2):39-49. (in Russian)
- Plyusnina I., Oskina I. Behavioral and adrenocortical responses to open-field test in rats selected for reduced aggressiveness toward humans. *Physiol. Behav.* 1997;61:381-385. DOI 10.1016/S0031-9384(96)00445-3.
- Popova N.K., Voitenko N.N., Pavlova S.I., Trut L.N., Naumenko E.V., Belyaev D.K. Genetics and phenogenetics of the hormonal characteristics of animals. VII. Correlation between brain serotonin and the hypothalamo-pituitary-adrenal system in domesticated and undomesticated silver foxes during emotional stress. *Genetika = Genetics (Moscow).* 1980;16:1865-1870. (in Russian)
- Prasolova L.A., Gerbek Yu.E., Gulevich R.G., Shikhevich S.G., Konoshenko M.Yu., Kozhemyakina R.V., Oskina I.N., Plyusnina I.Z. The effects of prolonged selection for behavior on the stress response and activity of the reproductive system of male grey rats (*Rattus norvegicus*). *Russian Journal of Genetics.* 2014;50(8):846-852. DOI 10.1134/S1022795414080031.
- Trut L.N., Naumenko E.V., Belyaev D.K. Change in the pituitary-adrenal function of silver foxes during selection according to behavior. *Genetika = Genetics (Moscow).* 1972;8(5):35-43. (in Russian)
- Trut L., Oskina I., Kharlamova A. Animal evolution during domestication: The domesticated fox as a model. *BioEssays.* 2009;31:349-360. DOI 10.1002/bies.200800070.
- Wang S-S., Mu R-H., Li C-F., Dong S-Q., Geng D., Liu Q., Yi L-T. microRNA-124 targets glucocorticoid receptor and is involved in depression-like behaviors. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2017;79:417-425. DOI 10.1016/j.pnpbp.2017.07.024.
- Weaver I.C.G., Cervoni N., Champagne F.A., D'Alessio A.C., Sharma S., Seckl J.R., Dymov S., Szyf M., Meaney M.J. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat. Neurosci.* 2004;7:847-854. DOI 10.1038/nn1276.



Влияние ингибитора гликолиза (2-ДГ) и разобщителя окисления и фосфорилирования (2,4-ДНФ) на метаболиты головного мозга

О.Б. Шевелев , М.П. Мошкин

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Отклонения в метаболизме головного мозга – результат долгосрочных патологических процессов, которые в конечном итоге проявляются как симптомы болезней Альцгеймера, Паркинсона или множественного склероза и многих других нейропатологий, как, например, диабетическая нейропатия. Дефицит доступной энергии для клеток головного мозга на фоне нейродегенеративных заболеваний может развиваться как под влиянием возрастного снижения экспрессии гликолитических ферментов, так и при индуцировании провоспалительными цитокинами разобщения окисления и фосфорилирования. Исходя из того, что активность многих ферментов находится под контролем аденозинтрифосфата (АТФ) или кофакторов, таких как никотинамидадениндинуклеотид (НАДН) и никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФН), дефицит энергии может быть причиной метаболических изменений в ткани мозга. В некоторых клинических исследованиях, в которых использовалась протонная ядерная магнитно-резонансная спектроскопия (^1H ЯМР спектроскопия), выявлены метаболические изменения в ткани головного мозга у пациентов с нейродегенеративными заболеваниями. Однако данные разных авторов довольно противоречивы, вероятно, из-за сложного генеза метаболических нарушений. В настоящем исследовании проверена гипотеза о разнонаправленных изменениях метаболизма под влиянием разобщителя окисления и фосфорилирования 2,4-динитрофенола (2,4-ДНФ) и 2-деокси-D-глюкозы (2-ДГ), блокирующей доступ глюкозы в клетки головного мозга. Методом ^1H ЯМР спектроскопии показано, что 2-ДГ приводит к преобладанию возбуждающих (глутамин + глутамат) нейромедиаторов над тормозными (гамма-аминомасляная кислота), а 2,4-ДНФ вызывает противоположные эффекты. Биохимические механизмы наблюдаемых изменений требуют специального исследования, однако можно отметить, что дефицит АТФ, вызванный ингибированием гликолиза, и дефицит АТФ, обусловленный действием разобщителей, сопровождаются разнонаправленными изменениями в интенсивности цикла трикарбоновых кислот. Эти изменения интенсивности цикла Кребса соотносятся с разнонаправленными изменениями баланса возбуждающих и тормозных нейромедиаторов. Полученные результаты показывают, что ^1H ЯМР спектроскопия может быть эффективным методом дифференцированной прижизненной оценки дефицита доступной энергии, вызванного общим подавлением энергообмена в нервных клетках или разобщением окисления и фосфорилирования.

Ключевые слова: метаболиты головного мозга; 2-деокси-D-глюкоза; 2,4-динитрофенол; ^1H ЯМР спектроскопия; нейродегенеративные заболевания.

Impact of glycolysis inhibitor (2-DG) and oxidation and phosphorylation uncoupler (2,4-DNP) on brain metabolites

O.B. Shevelev , M.P. Moshkin

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Deviations in brain metabolism are the result of long-term pathological processes, which finally are manifested as symptoms of Parkinson's or Alzheimer's diseases or multiple sclerosis and other neuropathologies, as for example diabetic neuropathy. A deficiency of available energy for brain cells under neurodegenerative diseases is either developed due to age-dependent underexpression of genes that encode glycolytic enzymes or induced due to the uncoupling of oxidation and phosphorylation that could be mediated by inflammatory cytokines. Since the activity of many enzymes is under the control of adenosine triphosphate (ATP) or cofactors, such as nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), energy deficiency can cause metabolic changes in brain tissue. Some clinical studies using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H NMR spectroscopy) revealed metabolic changes in brain tissue in patients with neurodegenerative diseases. However, data from different authors are quite contradictory, probably because of the complex genesis of metabolic disorders. In the present study, we tested the hypothesis of multidirectional changes in metabolism under the impact of the oxidation and phosphorylation uncoupler 2,4-dinitrophenol (2,4-DNP) and under the impact of 2-deoxy-D-glucose (2-DG), blocking the access of glucose to the brain cells. ^1H NMR spectroscopy showed that 2-DG leads to the predominance of excitatory (glutamine + glutamate) neurotransmitters over inhibitory ones (gamma-aminobutyric acid), and 2,4 DNP causes opposite effects. The biochemical mechanisms of the observed changes require a special study, but it can be noted that the ATP deficiency caused by inhibition of glycolysis and the ATP deficiency caused by the uncouplers are accompanied by differently directed changes in the intensity of the tricarboxylic acid cycle. These changes in the intensity of the Krebs cycle are correlated with differently directed changes in the balance of the exciting and inhibitory neurotransmitters. The obtained results show that ^1H NMR spectroscopy can be an effective method of differentiated lifetime

assessment of the available energy deficit caused by a general suppression of energy exchange in nerve cells or oxidation and phosphorylation uncoupling.

Key words: brain metabolites; 2-deoxy-D-glucose; 2,4-dinitrophenol; ^1H NMR spectroscopy; neurodegenerative diseases.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Шевелев О.Б., Мошкин М.П. Влияние ингибитора гликолиза (2-ДГ) и разобщителя окисления и фосфорилирования (2,4-ДНФ) на метаболиты головного мозга. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(2):235-239. DOI 10.18699/VJ18.353

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Shevelev O.B., Moshkin M.P. Impact of glycolysis inhibitor (2-DG) and oxidation and phosphorylation uncoupler (2,4-DNP) on brain metabolites. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(2):235-239. DOI 10.18699/VJ18.353 (in Russian)

Нейрогенеративные заболевания связаны с дисфункцией митохондрий нейронов и воспалительными процессами (Liu et al., 2017), что должно проявляться в метаболомных изменениях в патологических очагах головного мозга. Дефицит доступной энергии для клеток головного мозга на фоне нейродегенеративных заболеваний может развиваться как под влиянием возрастного снижения экспрессии гликолитических ферментов, так и при индуцировании провоспалительными цитокинами разобщения окисления и фосфорилирования. Поскольку активность многих ферментов регулируется уровнем аденозинтрифосфата (АТФ) или кофакторов, таких как никотинамидадениндинуклеотид (НАДН) и никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФН), дефицит энергии может приводить к метаболомическим изменениям в ткани мозга. Вместе с тем прижизненные исследования нейрометаболических методами спектроскопии ядерно-магнитного резонанса (ЯМР) дают противоречивые результаты (Waldman et al., 2002; Shiino et al., 2012). Отчасти это объясняется тем, что формирование дефицита энергии введением животным ингибитора гликолиза 2-деокси-D-глюкозы (2-ДГ) и экспериментальная активация воспалительных процессов при введении бактериального липополисахарида (ЛПС) вызывают разнонаправленные изменения спектра метаболитов в головном мозге (Moshkin et al., 2014). Одной из причин разнонаправленных метаболомных изменений при введении 2-ДГ и ЛПС может быть то, что ингибирование гликолиза подавляет весь каскад метаболомических процессов ресинтеза АТФ. Активация воспалительных процессов может приводить к дефициту доступной энергии (АТФ) из-за разобщения окисления и фосфорилирования (Moshkin et al., 2014).

В настоящем исследовании мы проверили гипотезу о разнонаправленных изменениях метаболизма под влиянием разобщителя окисления и фосфорилирования (2,4-ДНФ) и 2-ДГ, блокирующей доступ глюкозы в энергетический обмен клеток головного мозга.

Материалы и методы

Экспериментальные животные и условия содержания. Работа выполнена на базе ЦКП «SPF-виварий» ИЦиГ СО РАН (RFMEFI61914X0005, RFMEFI62114X0010). Исследовано 44 крысы линии Sprague-Dawley в возрасте 8–9 нед на начало исследования. Животных содержали по одному в индивидуально вентилируемых клетках высотой 20.5 см и площадью 929 см² (OptiRAT, Animal Care, США), при свободном доступе к воде и гранулированному корму

для лабораторных грызунов SPF-категории содержания (грызунов, свободных от видоспецифичных патогенов) «Чара» (ЗАО «Ассортимент-Агро», Россия); искусственном фотопериоде 14С:10Т; температуре 22–24 °С и влажности 40–50 %. В качестве подстилочного материала использовали сухие обеспыленные опилки (ООО «Альбион», Новосибирск). Корм и подстилку перед использованием автоклавировали при температуре 121 °С. Для поения животных использовали деионизированную воду, полученную на установке Millipore, после обогащения минеральной добавкой «Северянка» (ООО «Эко-проект», Санкт-Петербург). Содержание и изучение животных выполнено в соответствии с нормами GLP (Good Laboratory Practice) и правилами Комиссии по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН.

Схема эксперимента

Все препараты вводили внутривентриально за два часа до томографии.

1. Контроль (физиологический раствор) ($n = 10$).
2. Низкая доза 2-ДГ (500 мг/кг) ($n = 6$).
3. Высокая доза 2-ДГ (2000 мг/кг) ($n = 10$).
4. Низкая доза 2,4-ДНФ (12.5 мг/кг) ($n = 8$).
5. Высокая доза 2,4-ДНФ (50 мг/кг) ($n = 10$).

Низкие дозы препаратов были выбраны исходя из минимальных доз, приводящих к таким физиологическим эффектам, как снижение двигательной активности, изменение температуры тела, а высокие дозы обусловлены LD₅₀ (Perry et al., 2013; Moshkin et al., 2014).

Исследования нейрометаболических проводили на горизонтальном томографе с напряженностью магнитного поля 11.7 Тесла (Bruker, Biospec 117/16 USR, Германия). При помощи ^1H радиочастотных катушек исследовали уровни метаболитов коры головного мозга крыс. За 5 мин до сканирования на томографе крыс обезбуживали газовым наркозом (Isofluran, Baxter Healthcare Corp., США) при помощи наркозного аппарата (The Univentor 400 Anesthesia Unit, Univentor, Мальта). Температуру животных поддерживали благодаря использованию водного контура в томографическом столике-кроватке, имевшем температуру поверхности 30 °С. Под нижнюю часть туловища помещали пневматический датчик дыхания (SA Instruments, Stony Brook, N.Y., США), что позволяло контролировать глубину наркоза.

^1H -ЯМР спектроскопия. Все протонные спектры головного мозга крысы получены с использованием передающей объемной (500.3 МГц, диаметр 72/89 мм) и при-

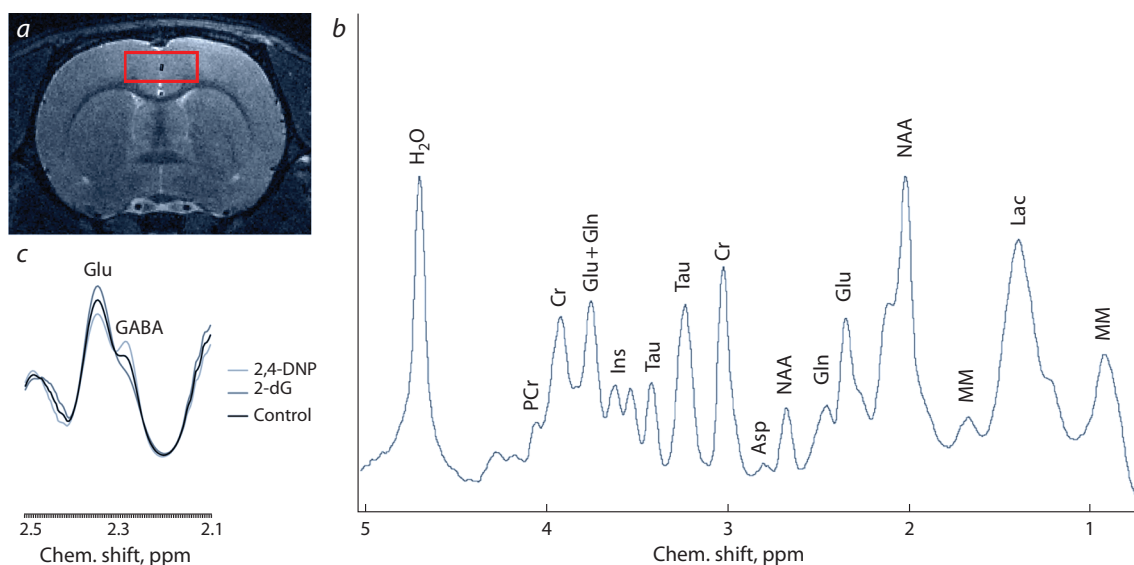


Fig. 1. NMR spectra of brain cortex.

(a) Voxel location in ^1H -MRS of brain cortex. (b) A typical NMR spectrum. (c) Changes in the NMR spectra in rats having received 2-dG, 2,4-DNP, or normal saline (control).

Ins, myo-inositol; PCr, phosphocreatine; Cr, creatine; Glu, glutamate; Gln, glutamine; Tau, taurine; Asp, aspartate; NAA, N-acetylaspartate; GABA, gamma-aminobutyric acid; Lac, lactate; MM, macromolecules.

емной поверхностной (500.3 МГц, размером $123 \times 64 \times 31$ мм) ^1H радиочастотных катушек. Для правильного позиционирования спектроскопических вокселей, размер которых составлял $1.6 \times 4.0 \times 3.0$ мм, методом RARE (rapid with relaxation enhancement) с параметрами импульсной последовательности TE = 11 мс, TR = 2.5 с были сняты T2-взвешенные изображения головного мозга крысы высокого разрешения (толщина среза 0.5 мм, поле обзора 2.5×2.5 см и размер матрицы 256×256 точек). Расположение вокселя на аксиальном срезе показано на рис. 1, а. Все протонные спектры получены с помощью пространственно-локализованной одновоксельной спектроскопии методом STEAM (stimulated echo acquisition mode spectroscopy) с параметрами импульсной последовательности TE = 3 мс, TR = 5 с и количеством накоплений 100. Перед каждым спектроскопическим измерением проводили настройку однородности магнитного поля в пределах выбранного вокселя с помощью методики FastMap. Подавление сигнала воды в спектрах осуществлялось с помощью импульса переменной мощности и оптимизированной задержки релаксационной последовательности (VAPOR).

Обработка ^1H спектров. Для обработки экспериментальных спектров ^1H МРС и определения количественного состава метаболитов использовалась оригинальная разработанная специализированная компьютерная программа, основанная, как и программный пакет LCModel (Provencher, 1993), на предположении о том, что спектр смеси известных соединений представляет собой линейную комбинацию спектров анализируемых компонентов. Подробное описание работы программы опубликовано в статье (Moshkin et al., 2014).

Статистика. Данные представлены как Mean $\pm$ SE. Сравнения средних значений с контролем выполнены на основе *t*-критерия Стьюдента. Для оценки влияния на соотношение возбуждающих и тормозных нейротрансмит-

теров проведен двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с факторами «доза» (высокая или низкая) и «препарат» (2-ДГ и 2,4-ДНФ).

Результаты

Протонная ЯМР спектроскопия коры головного мозга показала, что введение 2-ДГ в высокой дозе вызывает статистически значимое снижение уровней N-ацетиласпартата (NAA), ГАМК и фосфорилэтаноламина (PEA) по сравнению с контрольной группой. Введение 2,4-ДНФ приводит к повышению NAA и суммы креатин + фосфокреатин (Cr + PCr), причем эти изменения носят статистически значимый характер при низкой дозе 2,4-ДНФ (таблица).

Для проверки разнонаправленности метаболомных эффектов 2-ДГ и 2,4-ДНФ на животных, получавших препарат, проведен двухфакторный дисперсионный анализ с факторами «тип препарата» и «доза препарата». Статистически значимое взаимодействие факторов установлено для уровня холина (Cho) и соотношения возбуждающих и тормозных нейромедиаторов (см. таблицу). Причем для холина это взаимодействие было обусловлено существенным, почти двукратным его снижением при введении высокой дозы 2-ДГ и лишь статистически незначимой тенденцией к снижению при введении высокой дозы 2,4-ДНФ. Для баланса тормозных и возбуждающих нейротрансмиттеров высокие дозы препаратов вызвали статистически значимые разнонаправленные изменения (рис. 2). Введение 2-ДГ повышало соотношение возбуждающих и тормозных нейромедиаторов, а введение 2,4-ДНФ снижало его.

Обсуждение

Исследование изменений нейрометаболитов, вызванных введением 2-ДГ, выполненное на крысах линии Sprague-Dawley, как и в предыдущих (Moshkin et al., 2014) иссле-

Relative contents of individual metabolites (% of total metabolites) in rat brain cortex (*in vivo* ¹H-MRS)

Group	NAA	GABA	Ala	Asp	Cho	Cr	Glu±Gln
Control	15.91±0.30	6.42±0.40	5.26±1.10	0.47±0.22	1.11±0.13	9.69±0.31	13.49±0.60
Low 2-dG dose	16.61±0.77	5.73±1.01	6.59±1.47	1.18±0.69	1.31±0.23	10.92±0.82	13.06±1.83
High 2-dG dose	13.02±0.60*	4.16±0.74*	5.75±1.05	1.31±0.47	0.66±0.22	10.29±1.38	16.20±1.21*
Low 2,4-DNP dose	18.05±1.14*	6.25±0.54	6.39±2.01	0.39±0.19	1.26±0.16	11.76±0.97*	12.11±0.99
High 2,4-DNP dose	17.01±0.53	6.85±1.16	5.55±0.88	0.69±0.30	1.36±0.21	11.13±0.94	13.72±1.10
F _{1.30} (agent*dose)	2.625	2.605	0.006	0.151	4.606	0.045	1.819
p	0.116	0.117	0.940	0.701	0.040	0.833	0.188

End of table

Group	Ins	Tau	Gly	Lac	PEA	Exc/Inh
Control	3.10±1.09	4.36±0.36	20.09±2.61	6.54±1.39	13.57±1.22	2.30±0.21
Low 2-dG dose	2.32±0.96	5.54±0.41	24.81±2.42	4.36±0.99	7.58±1.35*	1.96±0.39
High 2-dG dose	2.93±1.91	5.23±0.55	22.48±2.85	3.98±1.56	13.99±2.83	4.66±1.08*
Low 2,4-DNP dose	1.88±0.94	4.67±0.52	22.58±3.59	5.86±1.22	8.79±1.31*	2.13±0.41
High 2,4-DNP dose	4.27±1.60	4.59±0.61	20.17±3.25	4.52±1.05	10.14±1.29	1.61±0.21*
F _{1.30} (agent*dosee)	0.174	0.002	0.06	0.114	1.675	5.247
p	0.680	0.961	0.807	0.738	0.206	0.030

NAA, N-acetylaspartate; GABA, gamma-aminobutyric acid; Ala, alanine; Asp, aspartate; Cho, choline; Cr, creatine; Glu + Gln, glutamine + glutamate; Ins, myoinositol; Tau, taurine; Gly, glycine; Lac, lactate; PEA, phosphorylethanolamine; EXC/Inh, the ratio between exciting and inhibitory transmitters. The data are shown as mean ± standard error of the mean.

* Statistically significant difference from the control group.

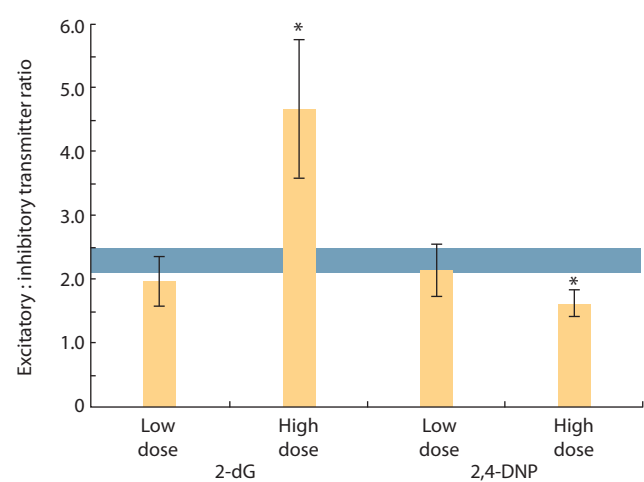


Fig. 2. Ratio between excitatory and inhibitory neurotransmitters. The dark band shows the range of values for the control group. Asterisks indicate statistically significant differences from the control group.

дованиях на мышах, показало, что блокирование энергетического обмена, обусловленное введением ингибитора гликолиза, смещает баланс возбуждающих и тормозных нейромедиаторов. Преобладание возбуждающих нейромедиаторов при энергетическом дефиците клеток головного мозга хорошо согласуется с повышением возбудимости

на начальных стадиях гипоксии (Mordel et al., 2016; Dang et al., 2017).

Кроме того, результаты исследования нейрометаболизма головного мозга сочетаются также с преобладанием возбуждающих нейромедиаторов над тормозными при таких состояниях энергетического дефицита, как селекция крыс на повышенную агрессивность, приводящая к снижению уровня глюкозы в мозге (Гулевич и др., 2015).

Прямо противоположная картина в изменениях нейротрансмиттеров наблюдается при введении 2,4-ДНФ, разобщителя окисления и фосфорилирования. Высокая доза 2,4-ДНФ вызывает смещение баланса возбуждающих и тормозных нейромедиаторов в пользу последних. Следует отметить, что введение 2,4-ДНФ модулирует метаболические изменения в переднем мозге крыс, схожие с таковыми при различных нарушениях сна, и, соответственно, выраженной сонливости (Kalinchuk et al., 2003).

Таким образом, сдвиги в соотношении возбуждающих и тормозных нейромедиаторов, обусловленные высокими дозами 2-ДГ и 2,4-ДНФ, хорошо согласуются с физиологическими состояниями, которые регистрируются либо при общем дефиците энергии, либо под воздействием факторов, приводящих к разобщению окисления и фосфорилирования. Биохимические механизмы наблюдаемых изменений требуют специального исследования, однако можно отметить, что дефицит АТФ, обусловленный ингибированием гликолиза, и дефицит АТФ, вызванный действием разобщителей, сопровождаются разнонаправ-

ленными изменениями в интенсивности цикла трикарбоновых кислот, и, соответственно, в балансе NAD^+/NADH . Эти изменения интенсивности цикла Кребса соотносятся с разнонаправленными изменениями баланса возбуждающих и тормозных нейромедиаторов.

Полученные результаты показывают, что ЯМР спектроскопия может быть эффективным методом дифференцированной прижизненной оценки дефицита доступной энергии, вызванного общим подавлением энергообмена в нервных клетках или разобщением окисления и фосфорилирования. Однако применение ЯМР спектроскопии при исследовании патологий мозга требует дополнительных сведений о причинах изменений мозгового энергообмена.

Acknowledgments

This study was supported by State Budgeted Project 0324-2018-0016. Use of the equipment of the Shared Access Center was supported by the Russian Ministry of Education and Science, project identifier RFMEFI62117X0015.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Dang Y.X., Shi K.N., Wang X.M. Early changes in glutamate metabolism and perfusion in basal ganglia following hypoxia-ischemia in neonatal piglets: A multi-sequence 3.0t MR study. *Front. Physiol.* 2017;8:237. DOI 10.3389/fphys.2017.00237.
- Gulevich R.G., Akulov A.E., Shikhevich S.G., Kozhemyakina R.V., Plyusnina I.Z. Proton magnetic resonance spectroscopy of neuro-metabolites in the hippocampi of aggressive and tame male rats. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2015;19(4):432-438. DOI 10.18699/VJ15.057. (in Russian)
- Kalinchuk A.V., Urrila A.S., Alanko L., Heiskanen S., Wigren H.K., Suomela M., Stenberg D., Porkka-Heiskanen T. Local energy depletion in the basal forebrain increases sleep. *Eur. J. Neurosci.* 2003; 17(4):863-869.
- Liu H., Dai C., Fan Y., Guo B., Ren K., Sun T., Wang W. From autophagy to mitophagy: the roles of P62 in neurodegenerative diseases. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2017; 49(5):413-422. DOI 10.1007/s10863-017-9727-7.
- Mordel J., Sheikh A., Tsohataridis S., Kanold P.O., Zehendner C.M., Luhmann H.J. Mild systemic inflammation and moderate hypoxia transiently alter neuronal excitability in mouse somatosensory cortex. *Neurobiol. Dis.* 2016;88:29-43. DOI 10.1016/j.nbd.2015.12.019.
- Moshkin M.P., Akulov A.E., Petrovski D.V., Saik O.V., Petrovskiy E.D., Savolov A.A., Koptug I.V. Proton magnetic resonance spectroscopy of brain metabolic shifts induced by acute administration of 2-deoxy-D-glucose and lipopolysaccharides. *NMR Biomed.* 2014;27:399-405. DOI 10.1002/nbm.3074.
- Perry R.J., Kim T., Zhang X.M., Lee H.Y., Pesta D., Popov V.B., Zhang D., Rahimi Y., Jurczak M.J., Cline G.W., Spiegel D.A., Shulman G.I. Reversal of hypertriglyceridemia, fatty liver disease, and insulin resistance by a liver-targeted mitochondrial uncoupler. *Cell Metab.* 2013;18(5):740-748. DOI 10.1016/j.cmet.2013.10.004.
- Provencher S.W. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn. Reson. Med.* 1993;30(6): 672-679.
- Shiino A., Watanabe T., Shirakashi Y., Kotani E., Yoshimura M., Morikawa S., Inubushi T., Akiguchi I. The profile of hippocampal metabolites differs between Alzheimer's disease and subcortical ischemic vascular dementia, as measured by proton magnetic resonance spectroscopy. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2012;32:805-815. DOI 10.1038/jcbfm.2012.9.
- Waldman A.D.B., Rai G.S., McConnell J.R., Chaudry M., Grant D. Clinical brain proton magnetic resonance spectroscopy for management of Alzheimer's and sub-cortical ischemic vascular dementia in older people. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 2002;35:137-142.

Антисмысловые олигонуклеотиды для исследований механизмов гипертонической болезни и ее терапии

Л.О. Климов^{1, 2}✉, А.А. Серяпина^{1, 2}, В.Ф. Зарытова^{1, 3}, А.С. Левина^{1, 3}, А.Л. Маркель^{1, 2}

¹ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Артериальная гипертония – одно из наиболее распространенных хронических заболеваний у взрослых и пожилых людей во всем мире. Эта патология не только снижает качество жизни больных, но и может сопровождаться высоким риском осложнений. Несмотря на то что в настоящее время на рынке имеется большое количество антигипертензивных средств, в основном представляющих собой различные комбинации ингибиторов ренин-ангиотензиновой системы, блокаторов адrenoрецепторов в сочетании с диуретиками, нет общепринятого «золотого стандарта» препаратов, которые не имели бы побочных эффектов. В обзоре рассматриваются основные аспекты применения антисмысловых олигонуклеотидов в контексте артериальной гипертонии. Известно, что введение антисмысловых олигонуклеотидов – один из способов выключения работы того или иного гена, причем ключевой особенностью данной методики, отличающей ее от других, является высокая селективность. Однако при несомненных преимуществах метода существуют сложности его применения, связанные как со свойствами самих олигонуклеотидов (недостаточная устойчивость и неэффективное проникновение в клетки), так и с многообразием механизмов возникновения той или иной патологии, в частности гипертонической болезни. В настоящей работе приведена краткая характеристика основных групп мишеней для антисмыслового ингибирования гипертонической болезни. Отдельно рассматриваются новейшие мишени для терапии олигонуклеотидами – регуляторные микроРНК. Кроме того, обсуждаются основные модификации антисмысловых нуклеотидов, разработанные для увеличения длительности эффектов их действия и упрощения приема препаратов данного типа, в частности комбинирование антисмысловых олигонуклеотидов с экспрессирующими векторами на основе аденовируса. Особенное внимание уделено антисмысловым олигонуклеотидам в составе нанокомпозитов. В обзоре обсуждаются результаты применения композитов антисмысловых нуклеотидов к гену ангиотензин-превращающего фермента и наночастиц диоксида титана (TiO₂) на крысах линии НИСАГ с индуцированной стрессом артериальной гипертонией. Показано, что использование антисмысловых олигонуклеотидов продолжает оставаться перспективной методикой для изучения механизмов возникновения различных форм гипертонической болезни, а также имеет высокий потенциал для терапевтического применения.

Ключевые слова: гипертоническая болезнь; антисмысловые олигонуклеотиды; крысы линии НИСАГ; наночастицы.

Antisense oligonucleotides for the arterial hypertension mechanisms study and therapy

L.O. Klimov^{1, 2}✉, A.A. Seryapina^{1, 2},
V.F. Zarytova^{1, 3}, A.S. Levina^{1, 3}, A.L. Markel^{1, 2}

¹ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

² Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

Arterial hypertension is one of the most common chronic diseases in adults all over the world. This pathology can not only reduce patients' life quality, but can also be accompanied by a number of complications. Despite the fact that there is a large group of antihypertensive drugs on the market, mainly representing different combinations of inhibitors of the renin-angiotensin system, adrenoceptor blockers in combination with diuretics, there is no generally accepted "gold standard" for drugs that would not have side effects. The review discusses the main aspects of antisense oligonucleotides use in the context of arterial hypertension. It is well known that the medical implementation of antisense oligonucleotides aims to block the expression of particular genes involved in the pathology development, and a key advantage of this technique is a high selectivity of the effect. However, with the undoubted advantages of the method, there are difficulties in its application, related both to the properties of the oligonucleotides themselves (insufficient stability and poor penetration into cells), and to the variety of mechanisms of the origin of a particular pathology, arterial hypertension, in our case. The review provides a brief description of the main molecular targets for antisense treatment of hypertensive disease. The newest targets for therapy with oligonucleotides – microRNAs – are discussed. The main modifications of antisense nucleotides, designed to increase the duration of their effects and simplify the delivery of this type of drugs to the targets are discussed, in particular, combining antisense oligonucleotides with adenovirus-based expression vectors. Particular attention is given to antisense oligonucleotides in the complex with nanoparticles. The review discusses the results of the use of titanium dioxide (TiO₂) containing antisense nanocomposites for the angiotensin converting enzyme in rats with stress induced arterial hypertension (ISIAH). It was shown that the use of antisense oligonucleotides continues to be

a promising technique for studying the mechanisms of various forms of hypertensive disease and has a high potential for therapeutic use.

Key words: hypertension; antisense oligonucleotides; ISIAH rat; nanoparticles.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Климов Л.О., Серяпина А.А., Зарытова В.Ф., Левина А.С., Маркель А.Л. Антисмысловые олигонуклеотиды для исследований механизмов гипертонической болезни и ее терапии. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(2):240-247. DOI 10.18699/VJ18.354

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Klimov L.O., Seryapina A.A., Zarytova V.F., Levina A.S., Markel A.L. Antisense oligonucleotides for the arterial hypertension mechanisms study and therapy. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(2):240-247. DOI 10.18699/VJ18.354 (in Russian)

Болезни сердечно-сосудистой системы по-прежнему являются основной причиной смертности в мире, и гипертония играет центральную роль в качестве триггера для возникновения серьезных осложнений, таких как инфаркт миокарда, мозговой инсульт и нефросклероз. Несмотря на успехи медицины в создании эффективных антигипертензивных препаратов, необходимый контроль за уровнем артериального давления (АД) в настоящее время установлен в среднем менее чем у половины пациентов, страдающих гипертонической болезнью (Furberg, Alderman, 2014). Кроме того, большинство современных гипотензивных препаратов имеет много побочных эффектов. Таким образом, необходим поиск новых, более безопасных и эффективных методов лечения.

Одна из ключевых особенностей гипертонической болезни (ГБ) – стойкое повышение уровня АД – может происходить вследствие сочетания многих факторов, как средовых, так и генетических, причем вклад последних в формирование гипертонического фенотипа может достигать 40–60 % (Dominiczak, 2016). Возможно значительное снижение эффективности лечения ГБ с применением классического набора антигипертензивных средств, так как фармакологическому воздействию подвергаются не непосредственная причина заболевания, а, по сути, конечные звенья механизма регуляции АД, которым адресованы фармакологические агенты. Поскольку при этом исходная причина болезни не устраняется, проводимая терапия должна иметь перманентный характер, что во многом определяет как появление побочных эффектов, так и наличие эффекта привыкания, связанного с процессом адаптации организма к длительной терапии (Xie et al., 2016).

Таким образом, возникло понимание необходимости разработки высокоэффективных и адресованных исходным причинам (генам) препаратов, которые демонстрируют высокую специфичность по отношению к индивидуальным, свойственным конкретному больному, механизмам развития ГБ (Phillips, 1999).

Наследственные факторы артериальной гипертонии обусловлены изменениями функций конкретных генов. Причиной этого могут быть как мутации, приводящие к образованию белка с измененными свойствами, так и сложные многостадийные процессы, влияющие на экспрессию определенных генов, определяющих функции систем регуляции АД. Поэтому контроль за уровнем экспрессии генов ключевых систем контроля АД уже давно является важным звеном в разработке современных подходов к лечению ГБ.

Методы применения коротких антисмысловых последовательностей олигонуклеотидов, направленных на подавление транскрипционной активности определенных генов, должны способствовать более специфичной терапии, приближенной к исходным причинам патологии. Первоначально считалось, что использование этой технологии должно быть относительно несложным в силу простоты идеи, лежащей в основе метода. Предполагается, что определенная последовательность ДНК за счет комплементарного взаимодействия может связываться со специфической мРНК, ответственной за экспрессию транскрипции соответствующих генов, и таким образом ингибировать синтез определенного белка. Идея использования производных олигонуклеотидов как перспективных терапевтических препаратов была высказана более 40 лет назад (Belikova et al., 1967). Эффективное применение так называемого антисенс-подхода впервые продемонстрировано на примере ингибирования репликации вируса саркомы Payca (Zamecnik, Stephenson, 1978). Эта работа привела к росту исследований, направленных на использование антисмысловых олигонуклеотидов.

Преимущества и проблемы использования олигонуклеотидов в качестве терапевтических агентов

Существенным достоинством терапии с использованием антисмысловых олигонуклеотидов по сравнению с доступными в настоящее время низкомолекулярными лекарствами является их способность действовать на генетическую первопричину заболевания за счет селективного распознавания определенных участков мишеней. Известно, что антисенс-олигонуклеотиды связываются с комплементарными участками таргетных РНК с образованием ДНК/РНК дуплексов, что ведет к блокированию функции РНК или ее расщеплению клеточными РНКазами (РНКаза-Н) (Spurgers et al., 2008; Bennett, Swayze, 2010; Mescalchin, Restle, 2011).

Таким образом, олигонуклеотиды могут избирательно блокировать синтез нежелательных белков, что может облегчить тяжесть течения заболевания и минимизировать побочные эффекты. Кроме того, возможно быстрое переадресирование олигонуклеотида на новую мишень путем изменения его нуклеотидной последовательности, в то время как на поиск новых фармацевтических препаратов могут понадобиться годы.

К настоящему времени десятки олигонуклеотидов, аптамеров, дезоксирибозимов, миРНК находятся на разных

стадиях клинических испытаний. Вкладываются значительные средства и усилия в создание лекарств нового поколения. Исследования на самых различных модельных системах подтвердили эффективность использования антисенс-олигонуклеотидов, однако эта стратегия пока не нашла широкого применения в медицинской практике. Основное препятствие для успешного применения антисенс-подхода – отсутствие эффективного способа доставки олигонуклеотидов и их различных производных к гену-мишени *in vitro* и *in vivo*. Во всех случаях для доставки олигонуклеотидов в клетки требуются дополнительные и в большинстве случаев токсичные трансфекционные реагенты (липофектамин, транспортные белки, липосомы) или физическое воздействие на клетки (электропорация).

Для доставки экзогенных НК в клетки используются две категории транспортеров: вирусные и невирусные векторы. Первые обеспечивают высокую эффективность трансфекции (Lim, 2012), однако представляют потенциальную опасность для организма, так как могут вызывать иммунный ответ, воспалительные реакции и даже канцерогенный эффект (Bouard et al., 2009).

Среди невирусных векторов широкое распространение получили катионные полимеры, разветвленные дендримеры, катионные липосомы, проникающие в клетки пептиды. Достаточно широко применяют наночастицы, которые по своей сути являются липосомами или подобными структурами (De Jong, Borm, 2008; Bonner et al., 2009; Paganjpe, Müller-Goymann, 2014). Различные способы доставки производных нуклеиновых кислот интенсивно исследуются, однако их эффективность для трансфекции клеток все-таки ниже, чем при использовании вирусных векторов. Доставке терапевтических олигонуклеотидов в клетки посвящена серия обзоров (Boisguérin et al., 2015; Juliano, Carver, 2015; Wickstrom, 2015), в которых рассмотрен большой массив литературных данных и сделано заключение о целесообразности разработки лекарственных препаратов на основе фрагментов нуклеиновых кислот, что подтверждено не только фундаментальными исследованиями, но практикой представителей фармации и медицины.

В последние годы для доставки олигонуклеотидов в клетки начали успешно использовать неорганические наночастицы: золото, диоксид титана, углеродсодержащие материалы, обладающие магнитными свойствами наноструктуры на основе оксида железа и др. (Parveen et al., 2012). К преимуществам наночастиц относят, в частности, возможность одновременного переноса лекарственного средства и сигнальной молекулы для оценки концентрации препарата в ткани. Помимо этого, дизайн наноконъюгата может быть подобран таким образом, чтобы осуществлять адресную доставку фармакологических агентов и улучшить фармакокинетику. Важное преимущество наночастиц по сравнению с другими транспортерами олигонуклеотидов – их способность защищать олигонуклеотиды от действия клеточных нуклеаз (Rosi et al., 2006; Pletnev et al., 2008).

Наночастицы диоксида титана привлекают особое внимание благодаря их способности проникать в клетки, биосовместимости, стабильности и возможности модификации поверхности для иммобилизации различных

соединений (Paunesku et al., 2003; Ravi Kumar et al., 2004; Fabian et al., 2008; Park et al., 2009). Показано, что TiO_2 -наночастицы в относительно низких дозах (до 0.2 мг/мл) не токсичны для клеток (Jeng, Swanson, 2006), бактерий (Heinlaan et al., 2008) и животных (Fabian et al., 2008).

Наночастицы диоксида кремния используются также в качестве транспортного средства для доставки нуклеиновых кислот в клетки (Roy et al., 2008; Liu et al., 2011). Показано, что наночастицы SiO_2 с аминогруппами на поверхности могут связывать плазмидную ДНК, обеспечивать ее проникновение в клетки и даже в клеточные ядра, а также предохранять ДНК от действия внутриклеточных рестриктаз (Roy et al., 2005). В другой работе (Bharali et al., 2005) продемонстрировано, что комплекс плазмидной ДНК с NH_2 -модифицированными SiO_2 -наночастицами обеспечивает трансфекцию клеток мозга мышей и экспрессию в них доставляемых генов. Кроме того, сделан вывод о нетоксичности использованных композитов. Кремний – один из микроэлементов в организме человека, продукт его биodeградации, ортокремниевая кислота $\text{Si}(\text{OH})_4$, найден почти во всех тканях человека. Во многих экспериментах показано, что кремниевая кислота, вводимая в человека, эффективно выходит из организма через почки (Park et al., 2009). Исследователи предполагают, что наночастицы силикагеля могут деградировать внутри лизосом, а растворенные продукты высвобождаются из клетки в кровяное русло и в дальнейшем выводятся через почки. Таким образом, выявлена способность наночастиц на основе силикагеля к биodeградации.

Доставка фрагментов нуклеиновых кислот в клетки – это только частичное решение проблемы их использования в живых системах. Другой важный аспект – доступность доставленных олигонуклеотидов для взаимодействия с мишенными нуклеиновыми кислотами внутри клетки. Очевидно, что стерические препятствия в случае прочно связанных с наночастицами олигонуклеотидов могут уменьшать эффективность их действия. Поэтому предпочтительнее использовать наноконъюгаты, в которых олигонуклеотиды соединены с наночастицами нековалентно. При этом после проникновения наноконъюгатов в клетки олигонуклеотиды могут высвобождаться с поверхности носителя и успешно выполнять свои функции.

Основные мишени для антисмысловой терапии гипертонической болезни

Ренин-ангиотензиновая система (РАС). Звенья ренин-ангиотензиновой системы по аналогии с известными фармакологическими блокаторами стали одними из первых мишеней для ингибирования ГБ. Показано, что такими мишенями могут быть гены ангиотензиногена и АТ1-рецептора ангиотензина-II. После однократного интрацеребровентрикулярного введения гипертоническим крысам линии SHR коротких (15 п. н.) антисмысловых олигонуклеотидов (ОДН), комплементарных мРНК этих генов, наблюдали достаточно продолжительное (до одной недели) снижение АД (Gyurko et al., 1993). Подобные эксперименты проведены на зрелых крысах, у которых артериальная гипертония была вызвана с помощью сужения почечных артерий (две почки – один зажим, 2K1C). Однако наблюдаемый антигипертензивный эффект в этом

эксперименте был менее продолжительным (Kagiyama et al., 2001). Следует отметить, что речь идет об ингибировании РАС мозга, что подчеркивает важность именно центральных механизмов контроля АД. Внутрисердечный метод введения антисмысловых препаратов использовался для ингибирования ангиотензин-превращающего фермента (АПФ). Величина, на которую при этом снижалось АД, меньше, чем при ингибировании AT1-рецептора (15 мм рт.ст. и 30–60 мм рт.ст. соответственно). Однако эффект снижения АД был устойчивым, и, кроме того, ингибирование АПФ приводило к уменьшению патологических изменений миокарда и почечных артерий (Wang et al., 2000).

Позже значительный антигипертензивный эффект был достигнут при ингибировании работы системной РАС антисмысловыми олигонуклеотидами, связанными с молекулами азиалогликопротеина, используемого в качестве носителя-доставщика (Sugano et al., 2000). Введение этого препарата привело к значительному снижению АД у крыс SHR (180.7 ± 4.4 мм рт.ст. по сравнению с 223.7 ± 4.8 мм рт.ст. у животных контрольной группы). Следует отметить, что в эксперименте применяли многократное введение этого препарата на протяжении нескольких недель. Это стало подтверждением эффективности ингибирования РАС с помощью антисмысловых ОДН в получении антигипертензивного эффекта, однако не позволяло говорить о потенциальной возможности терапевтического использования такой модификации олигонуклеотидов в связи с необходимостью их повторного внутривенного введения.

Интересным применением антисмысловых препаратов в исследованиях механизмов ГБ стало не только ингибирование звеньев каскада РАС, активация которых приводит к повышению АД, но также воздействие на функцию потенциальных вазодилататоров. Так, к примеру, показано, что ингибирование ангиотензиновых рецепторов AT2-типа непосредственно в почечном интерстиции на протяжении пяти дней вело к достаточно устойчивому повышению АД у нормотензивных животных. Тем самым, по сути, подтверждена вазодилататорная роль AT2-рецепторов (Moore et al., 2001).

Адренергическая система – следующая система контроля АД, на которую действовали антисмысловыми ОДН. Непосредственной мишенью были гены адренорецепторов.

Впервые эффекты действия антисмысловых ОДН на мРНК адренорецепторов при артериальной гипертонии показаны на крысах линии SHR со спонтанной гипертонией: однократное внутривенное введение антагониста к $\beta 1$ -адренорецептору в комплексе с липосомами привело к снижению АД на 38 ± 5 мм рт.ст., эффект сохранялся в течение 20 дней (Clare, Zhang et al., 1979; Zhang et al., 2000).

Эффективным оказалось также системное блокирование $\beta 1$ -адренорецептора у крыс с почечной гипертонией (модель 2K1C) при введении соответствующих ОДН в комплексе с липосомами. АД снизилось на 39 мм рт.ст., и эффект сохранялся до 27 дней. Помимо снижения АД, была нормализована сердечная функция, наблюдалось снижение массы миокарда левого желудочка и понижалась коллагенизация его стенки (Liang et al., 2007).

Позже было показано, что блокада $\alpha 2$ В-адренорецептора тоже ведет к снижению АД. Так, на модели гипертонии, индуцированной хирургическим удалением почек с последующей повышенной солевой нагрузкой у крыс, продемонстрировано, что интрацеребровентрикулярное введение антисмысловых олигонуклеотидов к $\alpha 2$ В-адренорецептору предотвращало повышение АД при солевой нагрузке, а также способствовало значительному уменьшению частоты сердечных сокращений (ЧСС): исходная ЧСС составляла 388 ± 12.9 уд./мин, ЧСС при солевой нагрузке – 385 ± 11.9 , ЧСС в течение 3–6 часов после введения ОДН – 306 ± 15.4 (Kintsurashvili et al., 2001). Первоначально коллектив исследователей не смог получить продолжительного эффекта. Тем не менее их последующая разработка рекомбинантного вектора позволила добиться того, что эффект антисмысловой терапии генов-адренорецепторов даже после однократного введения стал достигать не менее 16 дней (Shenouda et al., 2006). Однако попытки воспроизвести длительный антигипертензивный эффект с помощью этой же методики на крысах линии SHR со спонтанной гипертонией не привели к успеху (Ali, 2006; Triantafyllidi et al., 2006).

МикроРНК как потенциальная мишень для терапии ГБ с помощью антисмысловых ОДН. Активно развивающееся направление антисмысловой терапии, в частности терапии ГБ, – ингибирование регуляторных микроРНК (miR). Особенно перспективными выглядят подходы к лечению легочной формы гипертонической болезни. Впервые это показано на модели индуцированной гипоксией легочной гипертонии у мышей, у которых в качестве мишеней для ингибирования были miR-17, miR-21 и miR-92a. Продemonстрировано, что ингибирование miR-17 в результате внутривенного введения соответствующих антисмысловых антагонистов приводит к уменьшению систолического давления в правом желудочке, нормализации сердечного выброса и другим последствиям, характерным для ослабления легочной формы гипертонии, – например к снижению периферического сосудистого сопротивления в легочных артериях и уменьшению степени ремоделинга легочных кровеносных сосудов (Pullamsetti et al., 2012).

Впоследствии у крыс был открыт целый набор из более чем дюжины микроРНК, напрямую или косвенно участвующих в генезе легочной гипертонии и являющихся потенциальными мишенями для ее терапии. Эффекты ингибирования некоторых из них, в частности вышеупомянутая miR-17, а также miR-20a, уже проверены на экспериментальных моделях. Однако эти исследования показали, что действие таких антагонистов проявляется только после многократного применения, причем этот эффект может быть отсроченным. Кроме того, надежду на терапевтическое применение данных антагонистов сдерживают отсутствие каких-либо антидотов, а также потенциальная токсичность и недостаток информации о возможных осложнениях одновременного их применения с обычно используемыми фармацевтическими препаратами, например с гепарином, который, как известно, влияет на уровни циркулирующих микроРНК (Bienertova-Vasku et al., 2015). Тем не менее работы в данном направлении продолжают.

Помимо легочной гипертензии, описаны случаи системной артериальной гипертензии, когда микроРНК могут использоваться в качестве потенциальных мишеней для антигипертензивного воздействия с помощью антисмысловой терапии. Такими микроРНК могут быть miR, влияющие на экспрессию генов PAC как в почке, так и в других тканях (Zheng et al., 2010; Bátkai, Thum, 2012); miR-320, miR-143 и miR-145, непосредственно влияющие на ремоделирование сосудистой стенки и их тонус (Albinsen et al., 2011; Ling et al., 2013; Deng et al., 2015), а также некоторые другие.

Варианты методик применения антисмысловых нуклеотидов в терапии ГБ

В настоящее время нет сомнений в перспективности использования антисенс-терапии. Тем не менее следует отметить негативные последствия, вызванные избыточной дозировкой, что было показано при тестировании соответствующих препаратов антисмысловых олигонуклеотидов на приматах. Так, при исследовании токсического действия соответствующих препаратов у обезьян наблюдались некоторые негативные эффекты после болюсных внутривенных инъекций, включающие выраженные гемодинамические изменения, в том числе избыточную системную гипотензию и снижение сердечного выброса. В некоторых случаях имела место даже гибель животных (Farman, Kornbrust, 2003). Поэтому перед исследователями стоит достаточно сложная задача по разработке таких модификаций олигонуклеотидов, которые были бы, с одной стороны, полностью безопасны для человека, но, с другой стороны, обладали достаточно длительным эффектом, а методика приема препаратов была максимально упрощена. Для достижения продолжительного эффекта при относительно невысоких дозировках вводимого агента можно применять два различных подхода: разработку агента, введение которого обеспечивает наработку антисмыслового олигонуклеотида непосредственно в организме реципиента в необходимых количествах, и увеличение времени «жизни» экзогенных антисмысловых нуклеотидов за счет их стабилизации различными методами, в том числе с помощью наночастиц.

Аденовирус. Первым подходом, который в значительной степени смог бы упростить методику применения антисмысловых олигонуклеотидов и способствовать тому, чтобы эффекты, вызываемые ими, сохранялись дольше, стало использование экспрессируемых векторов на основе аденовируса. Такие векторные системы способны трансдуцировать различные типы клеток: делящиеся и неделящиеся, а также при их использовании достигаются высокие уровни экспрессии доставляемых генов. Исследования последних лет показали, что аденоассоциированные вирусы являются эффективными кардиотропными векторами (Cataliotti et al., 2011; Agüero et al., 2016).

В частности, в исследованиях гипертензии такой подход впервые применен для блокады AT1-рецептора у крыс SHR. Причем у взрослых животных антигипертензивное действие, вызываемое однократным введением соответствующих модифицированных вирусных плазмид, могло длиться два месяца, а у молодых крыс применение такого подхода позволяло надолго отсрочить развитие ГБ

(Phillips, 1997). Позже в качестве гена-мишени для такого подхода был использован ген ренина (т. е. одно из начальных звеньев каскада PAC). Обнаружено, что при гипертензии, вызываемой холодовым воздействием, ингибирование мРНК гена ренина может быть очень эффективным мерой по сравнению с известным фармакологическим ингибированием этого фермента (Wang et al., 2005).

Преимущество данного метода – возможность добиться локальной продукции требуемого олигонуклеотида за счет того, что последовательности антисмысловых РНК, интегрированные в состав генома вирусной частицы, находятся под контролем тканеспецифичных промоторов. Это позволяет исследовать механизмы возникновения ГБ, в частности процессы, происходящие в мозге, где измененная экспрессия мРНК гена в конкретной структуре мозга может быть необходимой для формирования гипертензивного статуса при различных формах ГБ. Так, показано, что ингибирование синтеза AT1-рецептора путем введения соответствующих конструкций в паравентрикулярное ядро гипоталамуса у крыс SHR может достаточно эффективно снижать АД, инактивировать симпатическую нервную систему, а также способствовать процессам ремоделирования миокарда и сосудов (Fan et al., 2012).

Следует отметить, что использование вирусных векторов имеет ряд ограничений, поскольку их применение может сопровождаться воспалительными реакциями или вызывать иммунный ответ. В связи с этим перспективы генной терапии, скорее всего, могут быть связаны с невирусными векторами, которые позволят осуществить контролируемую во времени и безопасную доставку препаратов на основе нуклеиновых кислот для регуляции экспрессии генов в организме реципиента (Turnbull et al., 2016).

Наночастицы. В случае гипертонической болезни использование наночастиц в качестве транспортного агента для препаратов различной природы может иметь важное практическое значение, так как при некоторых формах болезни применимы неинвазивные способы введения наночастиц пациентам при сохранении всех остальных преимуществ данной методики.

В связи с этим потенциальная терапия легочной формы гипертонической болезни, связанной с дисфункцией синтеза оксида азота и измененным уровнем экспрессии генов некоторых других систем, исследована достаточно подробно и привела к многообещающим результатам: интратрахеальное введение препарата аналога простаглицлина в комплексе с наночастицами крысам с экспериментальной легочной гипертензией вызывало снижение артериального давления в правом желудочке, уменьшение степени гипертрофии правого желудочка и гладкомышечной стенки легочных артерий; наблюдалось отсутствие обычных побочных действий исследуемого препарата – воспалительных процессов, кровоизлияний или фиброза тканей печени, почки, селезенки и сердца (Nakamura et al., 2017).

Помимо этого, применение рапамицина как в свободной форме, так и в комплексе с наночастицами на основе полиэтиленгликоля также ослабляло развитие легочной формы артериальной гипертензии у крыс. Гистологический анализ выявил минимальные изменения в толщине легочной артерии и отсутствие ремоделирования желудочков сердца.

Важно отметить, что крысы, получавшие рапамицин в наночастицах, имели менее выраженные побочные эффекты препарата по сравнению с животными, получавшими свободный рапамицин (Segura-Ibarra et al., 2017).

Ингибиторы фосфодиэстеразы 5-го типа (PDE-5), в том числе силденафилцитрат (СЦ), также являются эффективными фармакологическими агентами в лечении легочной гипертензии (Barnett, Machado, 2006). Тем не менее СЦ можно применять только перорально или парентерально с большим количеством рисков. Точечная доставка СЦ в легкие посредством ингаляции предпочтительна. Недавно получены твердые наночастицы липидной природы, которые могут служить переносчиками СЦ. Однако, несмотря на все плюсы данного метода, требуются экспериментальные и клинические испытания, которые смогут гарантировать безопасность применения СЦ пациентами с легочной формой гипертонической болезни (Makled et al., 2017).

Иные способы терапии легочной гипертензии включают ингибирование простаглицлинового пути с использованием аналогов PGI₂ (илопрост, триптостинил, эпопростенол); ингибирование эндотелина (ET-1, участвующий в пролиферации гладких мышц и вазоконстрикции) с использованием антагонистов рецепторов эндотелина (например, босентана, матиентана и амбрисентана) (Chan, Loscalzo, 2008). Нет сомнений, что применение нанокompозитов, имеющих в своем составе препараты, направленные на упомянутые мишени, также будет исследовано в ближайшее время.

Следует отметить, что данные методы используют комплексы наночастиц с разнообразными фармакологическими агентами с присущими им недостатками, например ограниченной селективностью. Поэтому разработка комплексов наночастиц с антисмысловыми олигонуклеотидами, объединяющая сильные стороны обоих методов (длительный эффект однократного приема препарата, высокая селективность), стала бы наиболее оптимальным решением проблемы терапии разнообразных форм гипертонической болезни, в том числе легочной.

Нанокompозиты такого типа уже исследуются. Например, с помощью внутривенного введения композитов антисмысловых нуклеотидов и наночастиц полиэтиленгликоля и полиэтиленimina ингибировали синтез ангиотензиногена у крыс SHR со спонтанной гипертензией: процедура приводила к снижению АД на 30 ± 4 мм рт. ст., которое сохранялось в течение более 10 дней. Введение этих нанокompозитов привело к значительному снижению гипертрофии миокарда. Настоящее исследование показало, что подавление экспрессии гена ангиотензиногена оказывает значительное ингибирующее действие на гипертонию и сердечную гипертрофию у крыс SHR (Yuan et al., 2015). Тем не менее высокая степень инвазивности данного метода создает трудности для возможного применения его в клинической практике.

В работе (Repkova et al., 2017) проведено сравнение внутрибрюшинного и ингаляционного методов доставки антисмысловых последовательностей к гену ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) в эксперименте на гипертонических крысах линии НИСАГ. Наследственная гипертензия крыс этой линии, обусловленная длительной селекцией на повышение АД в условиях мягкого эмоцио-

нального стресса, сопровождается, помимо прочего, изменениями экспрессии мРНК различных ферментов РАС, в том числе АПФ (Fedoseeva et al., 2013). Соответствующие антисмысловые ДНК-последовательности были связаны с полилизинном и диоксидом титана, образуя нанокompозиты вида TiO₂ · PL-DNA. Подобные нанокompозиты на основе диоксида титана отличаются низкой токсичностью и высокой специфичностью, что доказано в ряде экспериментов по ингибированию репликации вируса гриппа А в клеточной системе (Levina et al., 2012, 2015, 2016).

В случае применения подобных нанокompозитов, содержащих антисмысловую олигонуклеотид, направленный на мРНК гена АПФ, ингаляционный метод рассматривался как предпочтительный подход для терапии гипертензии у крыс, так как АПФ синтезируется в основном в эндотелии легочных сосудов. Однако существуют некоторые методические ограничения данного способа, такие как отсутствие гарантии вдыхания крысами полного объема препарата, трудности в расчете концентрации и т. д. (эти трудности, однако, могут быть преодолены в работе с пациентами). При использовании ингаляционного метода введения нанокompозитов снижение АД у крыс НИСАГ было более выраженным (приблизительно на 30 мм рт. ст.), но менее продолжительным, чем при внутрибрюшинном введении. Тем не менее при ингаляционном методе пониженный уровень АД сохранялся в течение двух недель (Repkova et al., 2017). Таким образом, представляется перспективным дальнейшее изучение различных способов доставки нанокompозитного препарата АПФ, в том числе усовершенствование ингаляционного метода введения.

В заключение следует отметить, что с учетом достаточно большого объема накопленных сведений о механизмах ингибирования транскрипционной активности определенных генов с помощью антисмысловых последовательностей, а также активного исследования различных способов повышения эффективности препаратов антисмысловых олигонуклеотидов, в том числе в составе нанокompозитов, антисмысловая терапия гипертонических состояний представляет собой многообещающее и перспективное направление дальнейших исследований.

Разработка неинвазивных способов применения препаратов, установление подходящих для поставленных целей структур нанокompозитов, исследование соотношения длительности воздействия антисмысловой терапии и возможной токсичности препаратов важны для определения наиболее эффективных методик применения антисмысловых олигонуклеотидов в клинической практике.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Science Foundation, project 16-15-10073, and the Russian Ministry of Education and Science, State Project 0324-2018-0016.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Aguero J., Ishikawa K., Hadri L., Santos-Gallego C.G., Fish K.M., Kohlbrenner E., Hammoudi N., Kho C., Lee A., Ibáñez B., García-Alvarez A., Zsebo K., Maron B.A., Plataki M., Fuster V., Leo-

- pold J.A., Hajjar R.J. Intratracheal gene delivery of SERCA2a ameliorates chronic post-capillary pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2016;67(17):2032-2046. DOI 10.1016/j.jacc.2016.02.049.
- Albinsson S., Skoura A., Yu J., DiLorenzo A., Fernández-Hernando C., Offermanns S., Miano J.M., Sessa W.C. Smooth muscle miRNAs are critical for post-natal regulation of blood pressure and vascular function. *PLoS ONE*. 2011;6(4):18869. DOI 10.1371/journal.pone.0018869.
- Ali Z.A. Making sense of antisense therapy for hypertension. *Hellenic J. Cardiol.* 2006;47(3):150-151.
- Barnett C.F., Machado R.F. Sildenafil in the treatment of pulmonary hypertension. *Vasc. Health Risk Manag.* 2006;2(4):411-422.
- Bátka S., Thum T. MicroRNAs in hypertension: mechanisms and therapeutic targets. *Curr. Hypertens. Rep.* 2012;14(1):79-87. DOI 10.1007/s11906-011-0235-6.
- Belikova A.M., Zarytova V.F., Grineva N.I. Synthesis of ribonucleosides and diribonucleoside phosphates containing 2-chloro-ethylamine and nitrogen mustard residues. *Tetrahedron Lett.* 1967;8(37):3557-3562. DOI 10.1016/S0040-4039(01)89794-X.
- Bennet C.F., Swayze E.E. RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2010;50(1):259-293. DOI 10.1146/annurev.pharmtox.010909.105654.
- Bharali D.J., Klejbor I., Stachowiak E.K., Dutta P., Roy I., Kaur N., Berg E.J., Prasad P.N., Stachowiak M.K. Organically modified silica nanoparticles: a nonviral vector for in vivo gene delivery and expression in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005;102(32):11539-11544. DOI 10.1073/pnas.0504926102.
- Bienertova-Vasku J., Novak J., Vasku A. MicroRNAs in pulmonary arterial hypertension: pathogenesis, diagnosis and treatment. *J. Am. Soc. Hypertens.* 2015;9(3):221-234. DOI 10.1016/j.jash.2014.12.011.
- Boisguérin P., Deshayes S., Gait M.J., O'Donovan L., Godfrey C., Betts C.A., Wood M.J., Lebleu B. Delivery of therapeutic oligonucleotides with cell penetrating peptides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015;87:52-67. DOI 10.1016/j.addr.2015.02.008.
- Bonner J.C., Card J.W., Zeldin D.C. Nanoparticle-mediated drug delivery and pulmonary hypertension. *Hypertension*. 2009;53(5). DOI 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.122846.
- Bouard D., Alazard-Dany N., Cosset F.-L. Viral vectors: from virology to transgene expression. *Br. J. Pharmacol.* 2009;157(2):153-165. DOI 10.1038/bjp.2008.349.
- Cataliotti A., Tonne J.M., Bellavia D., Martin F.L., Oehler E.A., Harders G.E., Campbell J.M., Peng K.W., Russell S.J., Malatino L.S., Burnett J.C. Jr, Ikeda Y. Long-term cardiac pro-B-type natriuretic peptide gene delivery prevents the development of hypertensive heart disease in spontaneously hypertensive rats. *Circulation*. 2011;123(12):1297-1305. DOI 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.981720.
- Chan S.Y., Loscalzo J. Pathogenic mechanisms of pulmonary arterial hypertension. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2008;44(1):14-30. DOI 10.1016/j.yjmcc.2007.09.006.
- Clare Zhang Y., Kimura B., Shen L., Phillips M.I. New beta-blocker: prolonged reduction in high blood pressure with beta(1) antisense oligodeoxynucleotides. *Hypertension*. 1979;35(1 Pt. 2):219-224. DOI 10.1161/01.HYP.35.1.219.
- De Jong W.H., Borm P.J.A. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int. J. Nanomed.* 2008;3(2):133-149.
- Deng L., Blanco F.J., Stevens H., Lu R., Caudrillier A., McBride M., McClure J.D., Grant J., Thomas M., Frid M., Stenmark K., White K., Seto A.G., Morrell N.W., Bradshaw A.C., MacLean M.R., Baker A.H. MicroRNA-143 activation regulates smooth muscle and endothelial cell crosstalk in pulmonary arterial hypertension. *Circ. Res.* 2015;117(10):870-883. DOI 10.1161/CIRCRESAHA.115.306806.
- Dominiczak A.F. Genetic basis of blood pressure and hypertension. *J. Hypertens.* 2016;34:e33.
- Fabian E., Landsiedel R., Ma-Hock L., Wiench K., Wohlleben W., van Ravenzwaay B. Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. *Arch. Toxicol.* 2008;82(3):151-157. DOI 10.1007/s00204-007-0253-y.
- Fan Z., Zhang L., Shi Z., Gan X.B., Gao X.Y., Zhu G.Q. Artificial microRNA interference targeting AT1a receptors in paraventricular nucleus attenuates hypertension in rats. *Gene Ther.* 2012;19(8):810-817. DOI 10.1038/gt.2011.145.
- Farman C., Kornbrust D. Oligodeoxynucleotide studies in primates: antisense and immune stimulatory indications. *Toxicol. Pathol.* 2003;31(1):119-122. DOI 10.1080/01926230390174995.
- Fedoseeva L.A., Antonov E.V., Klimov L.O., Dymshits G.M., Markel A.L. Function of the renin-angiotensin-aldosterone system in the ISIAH rats with stress – sensitive arterial hypertension. Eds. A. Himura, T. Sato. *Renin-Angiotensin System*. N. Y.: Nova Science Publishers, Inc, 2013;1-44.
- Furberg C.D., Alderman M.H. JNC 8: Shortcomings in process and treatment recommendations. *Am. J. Hypertens.* 2014;27(12):1443-1445. DOI 10.1093/ajh/hpu158.
- Gyurko R., Wielbo D., Phillips M.I. Antisense inhibition of AT1 receptor mRNA and angiotensinogen mRNA in the brain of spontaneously hypertensive rats reduces hypertension of neurogenic origin. *Regul. Pept.* 1993;49(2):167-174.
- Heinlaan M., Ivask A., Blinova I., Dubourguier H.C., Kahru A. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*. 2008;71(7):1308-1316. DOI 10.1016/j.chemosphere.2007.11.047.
- Jeng H.A., Swanson J. Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. *J. Environ. Sci. Health, Part A*. 2006;41(12):2699-2711. DOI 10.1080/10934520600966177.
- Juliano R.L., Carver K. Cellular uptake and intracellular trafficking of oligonucleotides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015;87:35-45. DOI 10.1016/j.addr.2015.04.005.
- Kagiyama S., Varela A., Phillips M.I., Galli S.M. Antisense inhibition of brain renin-angiotensin system decreased blood pressure in chronic 2-kidney, 1 clip hypertensive rats. *Hypertension*. 2001;37(2 Pt. 2):371-375. DOI 10.1161/01.HYP.37.2.371.
- Kintsurashvili E., Gavras I., Johns C., Gavras H. Effects of antisense oligodeoxynucleotide targeting of the α 2B-adrenergic receptor messenger RNA in the central nervous system. *Hypertension*. 2001;38(5). DOI 10.1161/hy1101.093426.
- Levina A.S., Repkova M.N., Ismagilov Z.R., Shikina N.V., Malygin E.G., Mazurkova N.A., Zinov'ev V.V., Evdokimov A.A., Baidorodn S.I., Zarytova V.F. High-performance method for specific effect on nucleic acids in cells using TiO₂-DNA nanocomposites. *Sci. Rep.* 2012;2:756. DOI 10.1038/srep00756.
- Levina A.S., Repkova M.N., Mazurkova N.A., Makarevich E.V., Ismagilov Z.R., Zarytova V.F. Knockdown of different influenza A virus subtypes in cell culture by a single antisense oligodeoxyribonucleotide. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2015;46(1):125-128. DOI 10.1016/j.ijantimicag.2015.03.004.
- Levina A.S., Repkova M.N., Mazurkova N.A., Zarytova V.F. Nanoparticle-mediated nonviral DNA delivery for effective inhibition of influenza A viruses in cells. *IEEE Trans. Nanotechnol.* 2016;15(2):248-254. DOI 10.1109/TNANO.2016.2516561.
- Liang Y., Lin S., Zhou Y., Wang J., Yu X. Beta-1 adrenergic receptor antisense-oligodeoxynucleotides ameliorates left ventricular remodeling in 2-Kidney, 1-Clip rats. *J. Biomed. Sci.* 2007;14(1):155-164. DOI 10.1007/s11373-006-9128-0.
- Lim K. Retroviral integration profiles: their determinants and implications for gene therapy. *BMB Rep.* 2012;45(4):207-212.
- Ling S., Nanhwan M., Qian J., Kodakandla M., Castillo A.C., Thomas B., Liu H., Ye Y. Modulation of microRNAs in hypertension-induced arterial remodeling through the β 1 and β 3-adrenoreceptor pathways. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2013;65:127-136. DOI 10.1016/j.yjmcc.2013.10.003.
- Liu Y., Lou C., Yang H., Shi M., Miyoshi H. Silica nanoparticles as promising drug/gene delivery carriers and fluorescent nano-probes: recent advances. *Curr. Cancer Drug Targets*. 2011;11(2):156-163.
- Makled S., Nafee N., Boraie N. Nebulized solid lipid nanoparticles for the potential treatment of pulmonary hypertension via targeted de-

- livery of phosphodiesterase-5-inhibitor. *Int. J. Pharm.* 2017;517(1): 312-321. DOI 10.1016/j.ijpharm.2016.12.026.
- Mescalchin A., Restle T. Oligomeric nucleic acids as antivirals. *Molecules.* 2011;16(12):1271-1296. DOI 10.3390/molecules16021271.
- Moore A.F., Heiderstadt N.T., Huang E., Howell N.L., Wang Z.Q., Siragy H.M., Carey R.M. Selective inhibition of the renal angiotensin type 2 receptor increases blood pressure in conscious rats. *Hypertension.* 2001;37(5):1285-1291. DOI 10.1161/01.HYP.37.5.1285.
- Nakamura K., Matsubara H., Akagi S., Sarashina T., Ejiri K., Kawakita N., Yoshida M., Miyoshi T., Watanabe A., Nishii N., Ito H. Nanoparticle-mediated drug delivery system for pulmonary arterial hypertension. *J. Clin. Med.* 2017;6(5):48. DOI 10.3390/jcm6050048.
- Paranjpe M., Müller-Goymann C. Nanoparticle-mediated pulmonary drug delivery: a review. *Int. J. Mol. Sci.* 2014;15(4):5852-5873. DOI 10.3390/ijms15045852.
- Park J.H., Gu L., Maltzahn G., Ruoslahti E., Bhatia S.N., Sailor M.J. Biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles for in vivo applications. *Nat. Mater.* 2009;8(4):331-336. DOI 10.1038/nmat2398.
- Parveen S., Misra R., Sahoo S.K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine.* 2012; 8(2):147-166. DOI 10.1016/j.nano.2011.05.016.
- Paunesku T., Rajh T., Wiederrecht G., Maser J., Vogt S., Stojićević N., Protić M., Lai B., Oryhon J., Thurnauer M., Woloschak G. Biology of TiO₂-oligonucleotide nanocomposites. *Nat. Mater.* 2003;2(5):343-346. DOI 10.1038/nmat875.
- Phillips M.I. Antisense inhibition and adeno-associated viral vector delivery for reducing hypertension. *Hypertension.* 1997;29(1 Pt 2): 177-187. DOI 10.1161/01.HYP.29.1.177.
- Phillips M.I. Is gene therapy for hypertension possible? *Hypertension.* 1999;33(1):8-13. DOI 10.1161/01.HYP.33.1.8.
- Pletnev D., Evdokimov A., Belanov E., Malygin E., Balachnin S., Serova O., Zinoviev V., Zarytova V., Levina A., Repkova M., Ismagilov Z., Shikina N., Zagrebelskiy S., Baiborodin S. Check of antiviral activity of nanocomposites with active check of antiviral activity of drugs based on nanocomposites, which contained oligonucleotides for direct splitting viral genome of influenza virus type A. *Antiviral Res.* 2008;78(2):A46. DOI 10.1016/j.antiviral.2008.01.092.
- Pullamsetti S.S., Doebele C., Fischer A., Savai R., Kojonazarov B., Dahal B.K., Ghofrani H.A., Weissmann N., Grimminger F., Bonauer A., Seeger W., Zeiher A.M., Dimmeler S., Schermuly R.T. Inhibition of microRNA-17 improves lung and heart function in experimental pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012;185(4):409-419. DOI 10.1164/rccm.201106-1093OC.
- Ravi Kumar M.N., Sameti M., Mohapatra S.S., Kong X., Lockey R.F., Bakowsky U., Lindenblatt G., Schmidt H., Lehr C.M. Cationic silica nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency in vitro and in vivo. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2004;4(7):876-881.
- Repkova M.N., Levina A.S., Seryapina A.A., Shikina N.V., Bessudnova E.V., Zarytova V.F., Markel A.L. Toward gene therapy of hypertension: Experimental study on hypertensive ISIAH rats. *Biochemistry (Mosc.).* 2017;82(4):454-457. DOI 10.1134/S000629791704006X.
- Rosi N.L., Giljohann D.A., Thaxton C.S., Lytton-Jean A., Han M.S., Mirkin C.A. Oligonucleotide-modified gold nanoparticles for intracellular gene regulation. *Science.* 2006;312(5776). DOI 10.1126/science.1125559.
- Roy I., Ohulchanskyy T.Y., Bharali D.J., Pudavar H.E., Mistretta R.A., Kaur N., Prasad P.N. Optical tracking of organically modified silica nanoparticles as DNA carriers: a nonviral, nanomedicine approach for gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005;102(2):279-284. DOI 10.1073/pnas.0408039101.
- Roy I., Stachowiak M.K., Bergey E.J. Nonviral gene transfection nanoparticles: function and applications in the brain. *Nanomedicine.* 2008;4(2):89-97. DOI 10.1016/j.nano.2008.01.002.
- Segura-Ibarra V., Amione-Guerra J., Cruz-Solbes A.S., Cara F.E., Iruegas-Nunez D.A., Wu S., Youker K.A., Bhimaraj A., Torre-Amione G., Ferrari M., Karmouty-Quintana H., Guha A., Blanco E. Rapamycin nanoparticles localize in diseased lung vasculature and prevent pulmonary arterial hypertension. *Int. J. Pharm.* 2017;524(1): 257-267. DOI 10.1016/j.ijpharm.2017.03.069.
- Shenouda S., Johns C., Kintsurashvili E., Gavras I., Gavras H. Long-term inhibition of the central α 2B-adrenergic receptor gene via recombinant AAV-delivered antisense in hypertensive rats. *Am. J. Hypertens.* 2006;19(11):1135-1143. DOI 10.1016/j.amjhyper.2006.04.001.
- Spurgers K.B., Sharkey C.M., Warfield K.L., Bavari S. Oligonucleotide antiviral therapeutics: Antisense and RNA interference for highly pathogenic RNA viruses. *Antivir. Res.* 2008;78:26-36. DOI 10.1016/j.antiviral.2007.12.008.
- Sugano M., Tsuchida K., Sawada S., Makino N. Reduction of plasma angiotensin II to normal levels by antisense oligodeoxynucleotides against liver angiotensinogen cannot completely attenuate vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* 2000; 18(6):725-731.
- Triantafyllidi H., Kintsurashvili E., Johns C., Gavras I., Gavras H. Central plasmid antisense administration reduces blood pressure inhibiting alpha2B adrenoceptor gene expression in spontaneously hypertensive rats in vivo. *Hellenic J. Cardiol.* 2006;47(3):144-149.
- Turnbull I.C., Eltoukhy A.A., Fish K.M., Nonnenmacher M., Ishikawa K., Chen J., Hajjar R.J., Anderson D.G., Costa K.D. Myocardial delivery of lipidoid nanoparticle carrying modRNA induces rapid and transient expression. *Mol. Ther.* 2016;24(1):66-75. DOI 10.1038/mt.2015.193.
- Wang H., Reaves P.Y., Gardon M.L., Keene K., Goldberg D.S., Gelband C.H., Katovich M.J., Raizada M.K. Angiotensin I-converting enzyme antisense gene therapy causes permanent antihypertensive effects in the SHR. *Hypertension.* 2000;35(1). DOI 10.1161/01.HYP.35.1.202.
- Wang X., Sun Z., Cade R. Prolonged attenuation of cold-induced hypertension by adenoviral delivery of renin antisense. *Kidney Int.* 2005;68(2):680-687. DOI 10.1111/j.1523-1755.2005.00446.x.
- Wickstrom E. DNA and RNA derivatives to optimize distribution and delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015;87:25-34. Available at: DOI 10.1016/j.addr.2015.04.012.
- Xie X., Atkins E., Lv J., Bennett A., Neal B., Ninomiya T., Woodward M., MacMahon S., Turnbull F., Hillis G.S., Chalmers J., Mant J., Salam A., Rahimi K., Perkovic V., Rodgers A. Effects of intensive blood pressure lowering on cardiovascular and renal outcomes: updated systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 2016; 387(10017):435-443. DOI 10.1016/S0140-6736(15)00805-3.
- Yuan L., Sheng J., Lu P., Wang Y.Q., Jin T., Du Q. Nanoparticle-mediated RNA interference of angiotensinogen decreases blood pressure and improves myocardial remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Mol. Med. Rep.* 2015;12(3):4657-4663. DOI 10.3892/mmr.2015.3909.
- Zamecnik P.C., Stephenson M.L. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1978;75(1):280-284.
- Zhang Y.C., Bui J.D., Shen L., Phillips M.I. Antisense inhibition of beta(1)-adrenergic receptor mRNA in a single dose produces a profound and prolonged reduction in high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Circulation.* 2000;101(6):682-688.
- Zheng L., Xu C.C., Chen W.D., Shen W.L., Ruan C.C., Zhu L.M., Zhu D.L., Gao P.J. MicroRNA-155 regulates angiotensin II type 1 receptor expression and phenotypic differentiation in vascular adventitial fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010;400(4):483-488. DOI 10.1016/j.bbrc.2010.08.067.

Tissue-specific effects of benzo[a]pyrene and DDT on microRNA expression profile in female rats

D.S. Ushakov^{1, 2}✉, T.S. Kalinina^{1, 3}, A.S. Dorozhkova¹, V.Y. Ovchinnikov⁴, L.F. Gulyaeva^{1, 2, 3}

¹ Institute of Molecular Biology and Biophysics, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State Pedagogical University, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

⁴ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Many xenobiotics in the human environment, such as benzo[a]pyrene (B(a)P) and dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), may act as non-genotoxic carcinogens through epigenetic mechanisms, including changes in microRNA expression profile. In part, such disorders can be mediated by the activation of nuclear receptors, resulting in the activation of protein coding gene expression and microRNAs involved in malignant transformation of cells. Therefore, the aim of this study was to investigate the chain of events "xenobiotic administration – receptor activation – up-regulating microRNA expression – down-regulation target genes expression" as one of the key factors in the chemically-induced carcinogenesis. Using *in silico* methods, an analysis of the rat genome was carried out to find microRNAs putatively regulated by AhR (aryl hydrocarbon receptor) and CAR (constitutive androstane receptor), activated by BP and DDT, respectively. In particular, miR-3577 and -193b were selected as potentially regulated CAR, miR-207 was selected as a candidate for miR under AhR regulation. The results of the study showed that the treatment of female rats with DDT and B(a)P caused a tissue-specific changes in the expression of microRNAs and host genes in both acute and chronic administration of xenobiotics. To confirm the effects of xenobiotics on the microRNA expression, we also estimated the mRNA level of *PTPN6*, *EIF3F*, *Cbx7*, and *Dicer1* genes potentially targeting miR-193b, -207, and -3577. The study has shown a high correlation between the expression of target genes and microRNAs; however these changes depended on the tissue types, the dose and time after xenobiotic treatment.

Key words: microRNA; target-genes; host-genes; qPCR-RT; bioinformatics; *in silico*; molecular biology; RNA interference.

Тканеспецифичные эффекты бенз[а]пирена и ДДТ на профиль экспрессии микроРНК у самок крыс

Д.С. Ушаков^{1, 2}✉, Т.С. Калинина^{1, 3}, А.С. Дорожкова¹, В.Ю. Овчинников⁴, Л.Ф. Гуляева^{1, 2, 3}

¹ Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный педагогический университет, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

⁴ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Многие ксенобиотики окружающей среды, такие как бенз[а]пирен (Б(а)П) и 1,1,1-трихлор-2,2-бис(4-хлорфенил)этан (ДДТ), обладают эпигенетическими механизмами повреждения клеток, приводящими к развитию канцерогенеза. Отчасти эти нарушения могут быть опосредованы активацией ядерных рецепторов, приводящей к активации экспрессии генов и микроРНК, участвующих в процессах злокачественной трансформации клеток. Поэтому целью данной работы было исследовать цепь событий «введение ксенобиотика – активация рецептора – повышение экспрессии микроРНК – понижение экспрессии гена-мишени» в качестве одного из ключевых факторов развития канцерогенеза. С помощью методов *in silico* проведен анализ генома крыс для поиска микроРНК, находящихся под регуляцией AhR (арил-гидрокарбонического рецептора) и CAR (конститутивного андростанового рецептора), активируемых под действием Б(а)П и ДДТ соответственно. В частности, miR-3577 и -193b были отобраны в качестве потенциально регулируемых CAR; miR-207 – как кандидат на микроРНК, находящийся под регуляцией AhR. Результаты исследования показали, что введение ДДТ и Б(а)П вызвало тканеспецифичное изменение экспрессии микроРНК и их генов-хозяев в случае как острого, так и хронического введения ксенобиотиков. Для подтверждения эффектов ксенобиотиков на экспрессию микроРНК мы также оценили уровень мРНК генов *PTPN6*, *EIF3F*, *Cbx7* и *Dicer1*, потенциально являющихся мишенями miR-193b, -207 и -3577. Исследование показало высокую связь экспрессии генов-мишеней и микроРНК, однако точный характер этих изменений зависел от типа ткани, времени после введения и дозы ксенобиотика.

Ключевые слова: микроРНК; гены-мишени; гены-хозяева; ОТ-ПЦР РВ; биоинформатика; *in silico*; молекулярная биология; РНК-интерференция.

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Ushakov D.S., Kalinina T.S., Dorozhkova A.S., Ovchinnikov V.Y., Gulyaeva L.F. Tissue-specific effects of benzo[a]pyrene and DDT on microRNA expression profile in female rats. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(2):248-255. DOI 10.18699/VJ18.355

Received 31.10.2017

Accepted for publication 14.12.2017

© AUTHORS, 2018

MicroRNAs (miRs) are short molecules with a length of 18–22 nucleotides, which play an important role in post-transcriptional regulation of gene expression. The mechanism of regulation of expression of protein-coding genes is determined by the degree of complementarity between the miRNAs and target mRNA. One of the mechanisms of such regulation is the RNA interference between the “seed” sequence of microRNA and the 3'-end (5'-end in less rare cases) of the mRNA transcribed from the target gene. In case of complete complementarity, binding of microRNAs to mRNA results in dissection and degradation of the latter, while mRNA translation is suppressed at the initiation or elongation stages, mRNA is destabilized by cleavage of the polyA-tail and sent to the P-body (processing bodies) (Brengues et al., 2005; Yue et al., 2011). A number of recent studies on quantitative and qualitative miRs have shown significant changes in the expression profile for various diseases, including cancer tumors (Hata, Kashira, 2015). Then, profiling the expression of miRs can be a valuable tool for the diagnosis and treatment of many diseases. However, the causes leading to a change in the expression of miRs remain unclear. Understanding molecular mechanisms regulating microRNA expression can explain the differences in the expression of protein-coding genes. Several different mechanisms involved in regulating the expression of microRNA at the transcriptional and post-transcriptional levels are assumed (Gulyaeva et al., 2016).

Transcriptional regulation includes changes in the host gene expression along with a change in intragenic miR or an independent change in miR expression having an intrinsic (intergenic) promoter. In this case, the change in expression can be achieved through signaling cell cascades triggered by various stimuli, including endogenous compounds, such as, for example, hormones and xenobiotics. The post-transcriptional mechanism is based on the changes in processing and stability of microRNAs (Finnegan, Pasquinelli, 2013). A growing body of evidence attests to the key role microRNAs play in chemically induced carcinogenesis. Experimental data demonstrate specific changes in the profile of microRNA expression under the influence of various carcinogens. Therefore, microRNAs can serve as markers of xenobiotic toxicity for early detection of cancer. For example, it has been demonstrated that the expression of 5 microRNAs (miR-29b, miR-31, miR-101a, miR-130a and miR-199a-5p) changes both in the treatment of embryonic fibroblasts by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (Agent Orange) and under the influence of ionizing radiation (Huomonen et al., 2015). Genomic sequencing methods enabled to observe the changes in the expression of microRNAs, including 5 up-regulated and 5 down-regulated microRNAs in hemopoietic progenitor cells of C57BL/6 mice after 4 weeks of continuous benzol administration (Wei et al., 2015). Expression of some miRs also significantly changed in human hepatocytes incubated with B(a)P, after that the transcript was sequenced using RNA libraries and significant changes in miRs expression profiles were revealed (Caiment et al., 2015). The authors proposed a new mechanism of action of this carcinogen, not according to the classical genotoxic scenario, but through epigenetic mechanisms involving miRs. Previous studies conducted by our team also showed that such known oncogenic miRs as miR-21, -221, -222, alter the expression in the liver of rats exposed to phenobarbital and DDT (Gulyaeva,

Kushlinskiy, 2016). In most cases, the precise mechanism of the effect of various exogenous and endogenous chemical compounds on the miR expression remains insufficiently studied. The activation of nuclear receptors, in cases when xenobiotics can be their ligands, with subsequent changes in the expression of target genes can be one of such mechanisms. In their turn, these genes can contain intronic (intragenic miRs), which will be co-expressed with host genes. It is possible that miRs having their own promoter (intergenic miRs) exist in the genome as well. Therefore, the goal of this study to test this assumption was set. The chosen compounds are ligands for nuclear receptors: DDT can activate CAR, while B(a)P can activate AhR. CAR is an orphan nuclear receptor that forms heterodimers with RXRa (retinoic X receptor) leading to nuclear translocation and transactivation of target genes. Activated CAR heterodimers bind to a number of regulatory regions of target genes eliciting transactivation of CYP2B genes (Xing et al., 2012). AhR is a transcription factor that responds to diverse ligands and plays a critical role in toxicology, immune function, and cardiovascular physiology (Harada et al., 2016). With bioinformatic analysis microRNAs whose promoters had promoters of host genes, as well as intergenic miRs were found, and their expression in different organs of female rats treated with these xenobiotics was investigated. The choice of females was due to the fact that DDT also has an estrogen-like effect, so its toxic effect may be more pronounced in females.

Materials and methods

Bioinformatic analysis of the rat genome. MicroRNA candidates were selected using search algorithms (Targetscan, miRDB, Diana-microT) and miRase (miRBase, UCSC, NCBI, Ensembl) databases or the microRNAs themselves, with DRE or PBREM sequences in the promoter region (Table 1). For selected miRs, their target genes according to the parameter of minimum free energy of duplexes were analyzed and selected. When choosing the target genes, TargetScan, miRTarget, miRanda, PITA algorithms were used.

Animals. Female Wistar rats weighing 150 g were taken from the nursery of the Institute of Clinical Immunology (Novosibirsk, Russia). 4 rats were injected DDT and 4 rats were injected with B(a)P once intraperitoneally, in doses of 50 mg/kg and 75 mg/kg, respectively, in a solution of 0.5 ml of vegetable oil. The control group ($n = 4$) received 0.5 ml of oil intraperitoneally. Animals were killed by decapitation 72 hours after the injection. Also, 16 rats were intraperitoneally injected with DDT and B(a)P in doses of 10 mg/kg (low-dose group, $n = 4$) and 50 mg/kg (high-dose group, $n = 4$) weekly. The control group ($n = 8$) received 0.5 ml of oil intraperitoneally weekly. Animals were killed by decapitation 13 weeks after the introduction of xenobiotics began. Animals were kept in natural light and with free access to water and food. All experimental procedures were approved by the Bioethics Committee of the Institute of Molecular Biology and Biophysics.

Isolation of microsomal fraction from liver. Rat liver was perfused with a solution containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) and 1.15 % KCl. A microsomal fraction was isolated at 4 °C according to a standard procedure; differential centrifugation of tissue homogenates was carried out in a medium containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) and 1.15 % KCl at 15,000 g for 15 min. The concentrations of microsomal proteins were

Table 1. A list of miRs, their host genes and target genes selected using *in silico* analysis

Responsive element in the promoter	Host-gene	MicroRNA	Target gene
DRE	<i>DnaJ</i>	miR-207	<i>PTPN6, EIF3F</i>
PBREM	Intergenic	miR-193b	<i>ERa, Cyclin D1</i>
	<i>Tmem94</i>	miR-3577	<i>Cbx7, Dicer1</i>

Table 2. Nucleotide sequences of stem-loop primers in studied microRNAs and comparison genes

Gene	Stem-loop primer sequence
U6	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTGGATACGACGGCCATGC-3'
U48	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTGGATACGAGACGGTCAG-3'
miR-207	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGATGGATCGATTAATATATGGCT-3'
miR-193b	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTGGATACGACTCTCGCCC-3'
miR-3577	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTGGATACGACCTAAGGGC-3'

Table 3. Nucleotide sequences of forward, reverse primers and cDNA probe of the microRNAs under study and reference genes

Gene	Primer type	Sequence
U6	Forward	5'-GCCGCATACAGAGAAGATTA-3'
	Reverse	5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'
	Probe	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACGGCCATGC-(BHQ1)-3'
U48	Forward	5'-CCATGAGTGTCTTCGCTGACG-3'
	Reverse	5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'
	Probe	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACGGCCATGC-(BHQ1)-3'
miR-207	Forward	5'-GCCGCCTTCTCCGAGGTA-3'
	Reverse	5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'
	Probe	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGAGAAAGGGAG-(BHQ1)-3'
miR-193b	Forward	5'-GCCGCGGGGTTTTGA-3'
	Reverse	5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'
	Probe	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACTCTCGCCC-(BHQ1)-3'
miR-3577	Forward	5'-GCCGCTCTGTCCCTCTTG-3'
	Reverse	5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'
	Probe	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACCTAAGGGC-(BHQ1)-3'

determined using the Bradford method. Protein samples were diluted with water and added to 1 ml of Bradford’s reagent (Fermentas®, Lithuania). Samples were incubated for 5 minutes at room temperature, and then the optical density of the solution was measured using an Agilent-8453 spectrophotometer at a wavelength of 595 nm against a control solution (water with reagent).

Determination of CYP activity. The enzymatic activity of cytochromes P450 was measured by the rate of O-dealkylation of 7-ethoxy-, 7-methoxy- and 7-pentoxy-resorufin (highly specific substrates for CYP1A1, CYP1A2 and CYP2B, respectively). The formation of the reaction product (resorufin) was determined kinetically using the fluorometric spectroscopy method ($\lambda_{\text{ex}} = 530$, $\lambda_{\text{em}} = 585$). Twenty milligrams of microsomal protein were added to 0.4 ml of the buffer (50 mM HEPES, 15 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, pH 7.6) containing the substrate (1 µg) and NADPH (1 mM); the reaction was

carried out with a large excess of substrate. One minute after the start of the reaction, the dependence of resorufin concentration on time became linear. The activity was measured in accordance with the total protein content. Resorufin was used as a standard for the calibration curve.

Isolation of total RNA for the determination of micro-RNA expression. Total RNA was isolated as described previously (Chanyshv et al., 2017). 500 µl of guanidine lysis buffer (4 M guanidine isothiocyanate, 25 mM sodium citrate, 0.3 % sarcosyl, 0.1 % 2-mercaptoethanol and 0.1 M sodium acetate) was added to 50 mg of tissue. The solution was mixed and incubated at 65 °C for 10 minutes. Samples were centrifuged at 10,000 g for 2 minutes, the supernatant was added to the equivalent volume of isopropanol, mixed, incubated at room temperature for 5 minutes, and centrifuged at 10,000 g for 2 minutes. Total RNA and mRNA samples were stored at –70 °C.

The reaction of reverse transcription. To obtain cDNA from the sample microRNA, a reverse transcription reaction was used with the following stem-loop primers with a set for reverse transcription (Biolabmix, Novosibirsk) according to the manufacturer's recommendations. The primers that were used are shown in Table 2.

Quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR). The relative microRNA expression level under study was determined by stem-loop RT subsequent real-time PCR using TaqMan technology and the PCR kit (Biolabmix, Novosibirsk) according to the manufacturer's recommendations on the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories). Small nuclear RNAs U6 and U48 were used as reference genes. The reaction was carried out under the following conditions: initiation denaturation at 94 °C for 2 min, 40 cycles; denaturation at 94 °C 0 s; annealing and elongation at 60 °C for 20 s. The relative level of expression was calculated using the ddCt method. Below the primers used in the study are shown in Table 3.

RNA isolation for the determination of mRNA expression. RNA was extracted from tissues using the TRIzol Reagent® kit (Ambion, USA) as recommended by the manufacturer. A qualitative evaluation of isolated RNA was performed by electrophoresis in a 1.5 % agarose gel containing ethidium bromide (5 µl per 100 ml) for RNA staining in UV. As a buffer for the gel, 1 × TBE (0.05 M Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 0.05 M H₃BO₃) was used. Visual control of the electrophoresis was performed using the VersaDoc Model 4000 (Bio-Rad Laboratories, USA). The quantification of the isolated RNA was determined spectrophotometrically using a Nanophotometer P 360 spectrophotometer (Implen, Germany).

Reverse transcription reaction. Reverse transcription to obtain cDNA was performed from a sample of RNA using a reverse transcription kit (Biolabmix, Russia) according to the manufacturer's recommendations.

RT-PCR in real time. The relative expression levels of host and target genes were determined by RT-PCR using reagents for PCR (Biolabmix, Russia) and the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories). The housekeeping genes *GAPDH*, *POL2A* and *18S* were used as reference genes. The primers used are shown in Table 4.

The PCR conditions were as follows: initiation denaturation at 95 °C for 3 min, 40 cycles; denaturation at 95 °C for 15 s; annealing at 58 °C for 20 s; elongation and removal of fluorescence data at 72 °C for 30 s. The specificity of PCR was checked by melting curves. The relative level of gene expression was calculated using the ddCt method.

Statistical analysis. The data is given as ±SD of three independent experiments. A comparison of the two groups was carried out according to Student's *t*-test, *p* < 0.05 was considered statistically significant.

Results

CYP activity in the liver, as an indicator of the effects of B(a)P and DDT

Many toxic compounds activate specific nuclear receptors and their target genes, primarily the proteins of the cytochrome P450 superfamily (CYP), which are direct indicators

Table 4. Nucleotide sequences of forward and reverse primers of housekeeping genes, host genes and target genes

Gene	Primer type	Sequence
<i>Gapdh</i>	Forward	5'-TAAAGGGCATCTGGGCTACACT-3'
	Reverse	5'-TTACTCCTTGGAGGCCATGTAGG-3'
<i>Pol2A</i>	Forward	5'-TGTATCCGTA CTACAGC-3'
	Reverse	5'-GTAGAAGAGGCGGGTAAC-3'
<i>18S</i>	Forward	5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'
	Reverse	5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'
<i>Tmem94</i>	Forward	5'-GTGCTGCTGCTCTTGTTG-3'
	Reverse	5'-TGGTCAATGATGCCCCGAAG-3'
<i>DnaJ</i>	Forward	5'-CTGTGCTACGCTCCTCTTCC-3'
	Reverse	5'-GGTTTGACCCCGAAGACATCA-3'
<i>ERa</i>	Forward	5'-TGCAGCAAGTGTACGAAGTGG-3'
	Reverse	5'-TTCGGCCTTCCAAGTCATCTC-3'
<i>Cyclin D1</i>	Forward	5'-GCCCTCCGTTTCTTACTTC-3'
	Reverse	5'-AGACCTCTCTTCGACTTC-3'
<i>Cbx7</i>	Forward	5'-ACCAAGCCTCTGAATGTGCT-3'
	Reverse	5'-GCAAGTTCGTTGTGCTGTGA-3'
<i>Dicer1</i>	Forward	5'-GAGTCTCTGCTGGTGCCAT-3'
	Reverse	5'-CACGGTGACTCTGACCTTCC-3'
<i>PTPN6</i>	Forward	5'-GGAAGTGGCCGAAACCGAAA-3'
	Reverse	5'-CCTGGTCATCCACCCTGACTG-3'
<i>EIF3F</i>	Forward	5'-CTCCGGGCCAGACCTCAA-3'
	Reverse	5'-TCAACAGCCACTTCATCTTCTG-3'

of toxic effects. Therefore, in the beginning of our experiment, we determined the activity of CYP1A1/2, the expression of which gene is controlled by AhR activation under the exposure with B(a)P, and the CAR-regulated gene *CYP2B*, which is activated by DDT. Both single-dose (75 mg/kg) and chronic administration of B(a)P to female rats (10 mg/kg and 50 mg/kg) was accompanied by a significant increase in 7-ethoxyresorufin-O-dealkylase activity in rat liver, indicating activation of AhR-regulated CYP1A (Table 5). On the contrary, a single dose of DDT (75 mg/kg) and chronic treatment for 3 months in low (10 mg/kg) and high doses (50 mg/kg), caused a significant increase in 7-pentoxoresorufin-O-dealkylase activity, which indicates the activation of CAR-regulated cytochrome P450 CYP1B.

Thus, the obtained results confirmed a significant increase in the expression of AhR- and CAR-regulated genes, which indicates activation of these receptors. In the chronic administration of both B(a)P and DDT, the dose-dependent effects of xenobiotics under study on the receptors are observed.

Experimental confirmation of the expression of host microRNA genes containing DRE and PBEM in the promoter in different organs of female rats

Bioinformatic analysis showed that the promoter of *DnaJ* and *Tmem94* genes contains DRE and PBEM elements, respec-

Table 5. O-dealkylation activity of CYPs in liver of rats after single and chronic administration of B(a)P and DDT, normalized to activity indices in the control group

Administration type	CYP1A1	CYP1A2	CYP2B
B(a)P			
Acute administration, 75 mg/kg	66.01 ± 13.28*	9.42 ± 1.51*	1.64 ± 0.24
Chronic administration, 10 mg/kg	4.57 ± 0.48*	3.50 ± 0.45*	2.23 ± 0.31
Chronic administration, 50 mg/kg	24.21 ± 3.38*	12.78 ± 1.32*	4.20 ± 0.37*
DDT			
Acute administration, 50 mg/kg	1.50 ± 0.41	0.92 ± 0.09	116.95 ± 5.22*
Chronic administration, 10 mg/kg	1.85 ± 0.29	1.98 ± 0.25	25.96 ± 5.14*
Chronic administration, 50 mg/kg	2.23 ± 0.21*	2.20 ± 0.39	30.79 ± 2.79*

* $p < 0.05$ compared with the control.

Table 6. Expression of host genes *DnaJ* and *Tmem94* in the liver, uterus, ovaries and mammary gland of rats, acute and chronically treated by B(a)P and DDT, respectively

Administration group	Liver	Ovary	Uterus	Mammary gland
<i>DnaJ</i>				
Control group	1 ± 0.5	1 ± 0.3	1 ± 0.2	1 ± 0.15
B(a)P				
Acute administration, 75 mg/kg	3.0 ± 0.8*	1.75 ± 0.25*	0.95 ± 0.1	2.25 ± 0.5*
Chronic administration, 10 mg/kg	1.8 ± 0.2*	1.2 ± 0.4	0.35 ± 0.1*	0.8 ± 0.03
Chronic administration, 50 mg/kg	2.7 ± 0.3*	1.1 ± 0.3	0.5 ± 0.05*	2.1 ± 0.3*
<i>Tmem94</i>				
DDT				
Acute administration, 50 mg/kg	1.55 ± 0.45	1.3 ± 0.35	1.2 ± 0.15	0.8 ± 0.3
Chronic administration, 10 mg/kg	2.1 ± 0.7	1.1 ± 0.9	0.4 ± 0.25	1.2 ± 0.5
Chronic administration, 50 mg/kg	1.75 ± 0.7	0.75 ± 0.3	0.6 ± 0.5	1.25 ± 0.35

Data are normalized to the control group. * $p < 0.05$ compared with the control.

tively. Therefore, the expression of these genes in liver, uterus, mammary gland and ovaries of female rats under the influence of DDT and B(a)P was studied. The data are given in Table 6.

As can be seen from the obtained results, tissue-dependent expression of AhR- and CAR-regulated genes under study was observed. Since these receptors are expressed mainly in liver, the highest increase in the expression of potential host genes for miR-207 and miR-3577 has been recorded in this organ. Thus, in the uterus, ovaries, mammary gland of rats under acute or chronic exposure to DDT there were no significant changes in the expression of *Tmem94*, the host gene for miR-3577, although in the liver gene expression tended to increase. One-time administration of B(a)P showed a significant increase in the expression of *DnaJ* gene in the liver, ovaries and mammary gland in 3, 1.7 and 2.3 times, respectively.

Measurement of miRs expression

The expression level of the target genes of those miRs, potentially regulated with AhR and CAR nuclear receptors, was determined (Table 7).

Chronic B(a)P administration resulted in a significant increase in the level of miR-207 in the liver of rats receiving both a low and high dose of a carcinogen (1.7 and 2.7 times, respectively) in comparison with control group. The mammary gland showed a 2-fold increase in the expression of miR-207 in rats receiving a high dose of B(a)P. In the ovaries, significant changes in the level of expression were not observed, while in the uterus a significant decrease in expression was observed in both experimental groups of animals (0.4 and 0.5 times, respectively).

One-time administration of B(a)P to female rats was accompanied by a 4-fold increase in the level of expression of miR-207 in the liver and a 2-fold increase in expression in the mammary gland (see Table 7). In the ovary and uterus, there was no change in the expression of this microRNA.

In the treatment of rats with a single dose of DDT, the expression of miR-193b also decreased 2-fold in the liver and 1.5-fold in the ovaries. The reason for this decrease remains unknown, it can be associated with the negative expression's regulation of this microRNA, which is intergenic and has its own promoter. In the remaining organs, no significant changes

Table 7. The expression of miR-207, miR-193b and miR-3577 in the liver, uterus, ovaries and mammary gland of rats, acute and chronically treated by B(a)P and DDT, respectively

Administration group	Liver	Ovary	Uterus	Mammary gland
miR-207				
B(a)P				
Acute administration, 75 mg/kg	4.1 ± 1.2*	1.6 ± 0.6	0.8 ± 0.2	2.4 ± 0.4*
Chronic administration, 10 mg/kg	1.75 ± 0.4	1.25 ± 0.3	0.3 ± 0.1*	0.8 ± 0.25
Chronic administration, 50 mg/kg	2.75 ± 0.3*	1.1 ± 0.2	0.5 ± 0.1*	2.1 ± 0.3*
miR-193b				
DDT				
Acute administration, 50 mg/kg	0.55 ± 0.05*	0.6 ± 0.25	0.5 ± 0.05	1.2 ± 0.3
Chronic administration, 10 mg/kg	0.6 ± 0.15	0.75 ± 0.2	1.8 ± 0.9	1.2 ± 0.3
Chronic administration, 50 mg/kg	0.55 ± 0.1	0.75 ± 0.1	1.6 ± 0.7	1.1 ± 0.2
miR-3577				
DDT				
Acute administration, 50 mg/kg	2.4 ± 0.5*	1.8 ± 0.25*	1.65 ± 0.35	1.1 ± 0.4
Chronic administration, 10 mg/kg	1.6 ± 0.55	0.75 ± 0.25	1.6 ± 0.7	1.2 ± 0.2
Chronic administration, 50 mg/kg	2.6 ± 0.4*	0.75 ± 0.1	1.5 ± 0.7	1.1 ± 0.35

Data are normalized to the control group. * $p < 0.05$ compared with the control.

Table 8. Expression of target genes (*PTPN6*, *EIF3F*, *Cbx7* and *Dicer1*) in rat organs, in the case changes in miR expression as potential regulators were statistically significant

Administration type	Organ	<i>PTPN6</i>	<i>EIF3F</i>
B(a)P			
Acute administration, 75 mg/kg	Liver	0.22 ± 0.13	0.14 ± 0.09
	Mammary gland	0.35 ± 0.15*	0.38 ± 0.15*
Chronic administration, 10 mg/kg	Liver	0.37 ± 0.15*	0.56 ± 0.05*
	Uterus	1.71 ± 0.42	1.7 ± 0.33
	Mammary gland	0.6 ± 0.3	0.8 ± 0.3
Chronic administration, 50 mg/kg	Liver	0.36 ± 0.17*	0.67 ± 0.1
	Uterus	1.38 ± 0.4	1.1 ± 0.35
	Mammary gland	0.52 ± 0.12*	0.41 ± 0.23*
DDT			
Acute administration, 50 mg/kg	Liver	0.7 ± 0.35	0.7 ± 0.35
	Ovary	0.45 ± 0.2	0.9 ± 0.3
Chronic administration, 10 mg/kg	Liver	0.8 ± 0.15	1.0 ± 0.5
Chronic administration, 50 mg/kg	Liver	0.3 ± 0.2	0.55 ± 0.4

Data are normalized to the control group. * $p < 0.05$ compared with the control.

in the expression of miR-193b were detected, which may also be due to low CAR activity in the ovaries, breast and uterus.

Chronic administration of DDT resulted in a significant 2.6-fold increase in the expression level of miR-3577 in the liver of rats treated by high-dose DDT. In the uterus, the expression level of this miR tended to increase. The expression level of miR-3577 was measured in an experiment with a single administration of DDT at a dose of 50 mg/kg. In this

case, it increased significantly in the liver (2.4 times) and in the ovaries (1.8 times). In other organs, no significant differences were found, which may be due to low CAR activity.

Expression of target genes for microRNAs

The expression level of the target genes of those miRs that were changed under xenobiotic exposure was determined (Table 8). In the mammary gland and liver, there was a sig-

nificant decrease in the expression of the miR-207 target genes *PTPN6* and *EIF3F* in various ways of B(a)P administration. There were no significant changes in the expression of *Cbx7* and *Dicer1*, which are putative miR-3577 target genes.

Discussion

The aim of our study was to investigate the mechanisms of xenobiotics exposure to the level of microRNA expression. As a model of the study, female rats treated with such well-known xenobiotics as B(a)P and DDT were selected. The choice of such compounds is based on the fact that they can activate AhR and CAR, respectively. Therefore, we observed a change in the expression of AhR- and CAR-regulated genes containing in DRE and PBEM promoters, in comparison with changes in the level of miRNA expression and their target genes in different organs of female rats treated with single or chronic doses of B(a)P and DDT. As follows from the results obtained, the effects of studied chemicals depended on both the dose and the time of exposure. The most pronounced effects were observed in the liver: for example, in the case of a single injection of B(a)P, the expression of the AhR-dependent *DnaJ* gene doubly increased in comparison with the control group. Chronic B(a)P administration showed a dose-dependent character of elevated gene expression: 1.8 and 2.7 times with respect to control for low- and high-dosage groups respectively. In hormone-dependent organs – ovaries, uterus and mammary gland – the tendency to increase in expression was less pronounced. For example in the uterus, the expression of the *DnaJ* gene decreased with a chronic B(a)P exposure of 0.35 and 0.5 times with respect to control in the case of low- and high-dosage groups. The *Tmem94* gene did not show significant changes in uterine expression with a single administration of DDT.

It is important to note that the change in the gene expression under study is most pronounced with a single dose exposure, whereas in the chronic variant the expression parameters were lower. It can probably be attributed to the toxic effect. Other studies have also shown that chronic effects of B(a)P or DDT can induce apoptosis (Stolpmann et al., 2012; Marouani et al., 2017). The host genes were also unequally expressed in different rat organs, which may be due to the expression level of the receptors themselves. The maximum expression level was observed in the liver, where, as is known, activity of AhR and CAR is high. Nevertheless, we analyzed the coexpression of host genes–miRNA–target genes in the extrahepatic organs too. According to the obtained data, the miR-207 expression profile was similar in many respects to the expression of the *DnaJ* host gene. Thus, for example, the maximum increase in miR-207 expression was observed in the liver: 4.1, 1.75 and 2.75 times in case of single and chronic low- and high-dosage groups, respectively, and the effect was statistically significant.

In the uterus, the expression of miR-207 decreased, and in case of chronic administration it was 0.3 and 0.5 times reliably with respect to control. In the ovaries, however, no significant changes were observed, but there was a tendency to increase the expression level. In the mammary glands, however, miR-207 expression significantly increased in 2.4 and 2.1 fold in groups with acute and chronic high-dose B(a)P injection, respectively. It should be noted that miR-207 expression increases with Lewis lung carcinoma (Vaidotas et al., 2016).

There is also evidence of an increase in apoptosis induced by radiation through the interference of miR-207 with the *Act3* gene (Tan et al., 2014).

Expression of target genes *PTPN6* and *EIF3F* decreased in organs that showed a significant increase in miR-207. Expression of the *PTPN6* gene, which encodes protein tyrosine phosphatase, involved in such cellular processes as differentiation and mitotic cycle significantly decreased in the liver, uterus and mammary gland. It is shown that the loss of the function of this protein leads to JAK3-mediated dysregulation of the STAT3 signaling pathway (Demosthenous et al., 2015). The results also showed a decrease in the expression of the *EIF3F* gene, an important regulator of translation and apoptosis in cancer cells (Shi et al., 2006). Consequently, the chain of events: B(a)P–AhR–host gene *DnaJ*–miR-207–target genes *PTPN6* and *EIF3F* may underlie the epigenetic mechanism of action of this carcinogen. Expression level of miR-3577 had a tendency to increase; the greatest change was observed in the liver (in 2.4, 1.6 and 2.6 times with respect to control with a single, chronic low- and high-dose administration, respectively). The level of expression of miR-3577 in the ovaries and mammary gland did not change reliably. Other researchers also showed a change in the level of microRNA expression under the influence of B(a)P and DDT. Thus, the expression of microRNA was significantly changed when human hepatocytes were incubated with benzo[a]pyrene.

Using two different RNA libraries, a whole transcriptome of these cells was sequenced and a conclusion was drawn on a new look at the mechanism of action of this carcinogen (Wei et al., 2015). Enhanced expression of miR-410 and miR-122 in human hepatoma HepaRG cells in response to Aflatoxin B1 and benzo[a]pyrene was also shown (Marrone et al., 2016). These facts suggest that changes in microRNA expression profile can reflect the early events of the non-genotoxic mechanism of action of these genotoxic carcinogens. DDT can also affect the expression of miRNA in mammary cells (Tilghman et al., 2012). This study identified microRNA expression profiles in MCF-7 cells by incubation with estradiol, BPA or DDT confirmed estrogen-like effects of EDCs, although there were differences from the natural hormone. It should be noted that a number of theoretical studies have been published earlier that have shown the interrelation of the expression of miRNA, transcription factors, “host genes” and targets for miRNA in various malignant tumors (Ye et al., 2014; Song et al., 2015). Our results have experimentally confirmed this mechanism, although it largely depends on the tissue type, time and dose of exposure to xenobiotics.

Conclusion

Thus, among a variety of mechanisms regulating the expression of microRNAs, a special place is taken by the mechanisms of activation of receptors-xenosensors, which are able to be activated by xenobiotics-ligands. A large number of toxic compounds are known to be incapable of adduct formation with DNA or proteins (such as DDT or TCDD), they act according to different, epigenetic mechanisms. Moreover, genotoxic compounds, such as PAHs, including B(a)P, can not only form DNA adducts, but also bind to AhR, activating multiple target genes, including microRNAs. The results of our work showed that, in fact, the activation of AhR- and

CAR-regulated genes under the B(a)P and DDT exposure is accompanied by an increase in the transcription of their target genes, not only CYPs, but also other genes, including *Tmem94* and *DnaJ*. With these genes, miR-3577 and miR-207 are co-expressed.

Acknowledgments

The reported study was funded by RFBR according to the research project No. 15-03-01700.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Bregues M., Teixeira D., Parker R. Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science*. 2005;310(5747):486-489. DOI 10.1126/science.1115791.
- Caiment F., Gaj S., Claessen S., Kleinjans J. High-throughput data integration of RNA-miRNA-circRNA reveals novel insights into mechanisms of benzo[a]pyrene-induced carcinogenicity. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:2525-2534. DOI 10.1093/nar/gkv115.
- Chanyshv M.D., Ushakov D.S., Gulyaeva L.F. Expression of miR-21 and its *Acat1*, *Armcx1*, and *Pten* target genes in liver of female rats treated with DDT and benzo[a]pyrene. *Mol. Biol. (Mosk)*. 2017; 51(4):664-670. DOI 10.7868/S0026898417040085.
- Demosthenous C., Han J.J., Hu G., Stenson M., Gupta M. Loss of function mutations in PTPN6 promote STAT3 deregulation via JAK3 kinase in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget*. 2015;6(42): 44703-44713. DOI 10.18632/oncotarget.6300.
- Finnegan E.F., Pasquinelli A.E. MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol*. 2013;48:51-68. DOI 10.3109/10409238.2012.738643.
- Gulyaeva L.F., Chanyshv M.D., Kolmykov S.K., Ushakov D.S., Nechkin S.S. Effect of xenobiotics on microRNA expression in rat liver. *Biomed. Khim*. 2016;62(2):154-159. DOI 10.18097/PBMC 20166202154.
- Gulyaeva L.F., Kushlinskiy N.E. Regulatory mechanisms of microRNA expression. *J. Transl. Med*. 2016;14(1):143-153. DOI 10.1186/s12967-016-0893-x.
- Harada T., Takeda M., Kojima S., Tomiyama N. Toxicity and carcinogenicity of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT). *Toxicol. Res*. 2016;32(1):21-33. DOI 10.5487/TR.2016.32.1.021.
- Hata A., Kashima R. Dysregulation of microRNA biogenesis machinery in cancer. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol*. 2015;1:1-14. DOI 10.3109/10409238.2015.1117054.
- Huomonen K., Korkalainen M., Viluksela M., Lahtinen T., Naarala J., Juutilainen J. Role of microRNAs and DNA methyltransferases in transmitting induced genomic instability between cell generations. *Front. Public Health*. 2015;2(139):1-9. DOI 10.3389/fpubh.2014.00139.
- Marouani N., Hallegue D., Sakly M., Benkhalifa M., Ben Rhouma K., Tebourbi O. p,p'-DDT induces testicular oxidative stress-induced apoptosis in adult rats. *Reprod. Biol. Endocrinol*. 2017;15:40. DOI 10.1186/s12958-017-0259-0.
- Marrone A.K., Tryndyak V., Beland F.A., Pogribny I.P. MicroRNA responses to the genotoxic carcinogens aflatoxin B₁ and benzo[a]pyrene in human HepaRG cells. *Toxicol. Sci*. 2016;149(2):496-502. DOI 10.1093/toxsci/kfv253.
- Shi J., Kahle A., Hershey J.W., Honchak B.M., Warneke J.A., Leong S.P., Nelson M.A. Decreased expression of eukaryotic initiation factor 3f deregulates translation and apoptosis in tumor cells. *Oncogene*. 2006;25(35):4923-4936. Epub 2006 Mar 13. DOI 10.1038/sj.onc.1209495.
- Song C., Xu Z., Jin Y., Zhu M., Wang K., Wang N. The network of microRNAs, transcription factors, target genes and host genes in human renal cell carcinoma. *Oncol. Lett*. 2015;9(1):498-506. DOI 10.3892/ol.2014.2683.
- Stolpmann K., Brinkmann J., Salzmann S., Genkinger D., Fritsche E., Hutzler C., Wajant H., Luch A., Henkler F. Activation of the aryl hydrocarbon receptor sensitizes human keratinocytes for CD95L- and TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death Dis*. 2012;3(9):e388. DOI 10.1038/cddis.2012.127.
- Tan P.X., Du S.S., Ren C., Yao Q.W., Zheng R., Li R., Yuan Y.W. MicroRNA-207 enhances radiation-induced apoptosis by directly targeting Akt3 in cochlea hair cells. *Cell Death Dis*. 2014;5:e1433. DOI 10.1038/cddis.2014.407.
- Tilghman S.L., Bratton M.R., Segar H.C., Martin E.C., Rhodes L.V., Li M., McLachlan J.A., Wiese T.E., Nephew K.P., Burrow M.E. Endocrine disruptor regulation of microRNA expression in breast carcinoma cells. *PLoS One*. 2012;7:e32754. DOI 10.1371/journal.pone.0032754.
- Vaidotas S., Gintautas V., Danute B., Kestutis S. Gene and miRNA expression signature of Lewis lung carcinoma LLC1 cells in extracellular matrix enriched microenvironment. *BMC Cancer*. 2016;16:789. DOI 10.1186/s12885-016-2825-9.
- Wei H., Zhang J., Tan K., Sun R., Yin L., Pu Y. Benzene-induced aberrant miRNA expression profile in hematopoietic progenitor cells in C57BL/6 mice. *Int. J. Mol. Sci*. 2015;16:27058-27071. DOI 10.3390/ijms161126001.
- Xing Y., Nukaya M., Satyshur K.A., Jiang L., Stanevich V., Korkmaz E.N., Burdette L., Kennedy G.D., Cui Q., Bradfield C.A. Identification of the Ah-receptor structural determinants for ligand preferences. *Toxicol. Sci*. 2012;129(1):86-97. DOI 10.1093/toxsci/kfs194.
- Ye S., Yang L., Zhao X., Song W., Wang W., Zheng S. Bioinformatics method to predict two regulation mechanism: TF-miRNA-mRNA and lncRNA-miRNA-mRNA in pancreatic cancer. *Cell Biochem. Biophys*. 2014;70:1849-1858. DOI 10.1007/s12013-014-0142-y.
- Yue S.B., Trujillo R.D., Tang Y., O'Gorman W.E., Chen C.Z. Loop nucleotides control primary and mature miRNA function in target recognition and repression. *RNA Biol*. 2011;8(6):1115-1123. DOI 10.4161/rna.8.6.17626.

Влияние биологически активного препарата Флоравит® на строение кожи и волоса у соболей (*Martes zibellina*)

Н.Н. Лоенко¹✉, И.Е. Чернова², Т.С. Куницына³

¹ Научно-исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства имени В.А. Афанасьева, Московская область, Раменский район, пос. Родники, Россия

² Федеральное государственное унитарное предприятие «Русский соболь», Московская область, Пушкинский район, пос. Зверосовхоз, Россия

³ Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина, Москва, Россия

Поиск новых высокоэффективных многокомпонентных препаратов, способных воздействовать сразу на несколько систем гомеостаза животного для повышения физиологической адаптации пушных зверей к различным условиям питания, имеет важное значение. Подобным действием обладает кормовая добавка Флоравит® – природный биорегулятор. Препарат представляет собой композицию биологически активных веществ, продуцируемых мицелиальным грибом *Fusarium sambucinum*. В настоящей работе изучали влияние Флоравита® на строение кожи и волоса у взрослых самок соболей (*Martes zibellina*). Научно-хозяйственный опыт выполняли в ОАО «Племзавод Пушкинский» Московской области в период формирования у зверей зимнего волосного покрова в октябре–ноябре. Изучение морфологического строения волосного и кожного покровов проводили на основных топографических участках шкурок: хребте, боку и огулке. Структуру остевых волос на основных топографических участках исследовали на сканирующем электронном микроскопе. Установлено, что введение *per os* биологически активного препарата Флоравит® взрослым самкам соболей из расчета 1.0 мл на голову в сутки в период формирования зимнего волосного покрова в октябре–ноябре влияет на морфологическую структуру всех категорий волос на топографических участках шкурок. В опытной группе животных под воздействием Флоравита® длина направляющих волос на хребте и боку в сравнении с контролем увеличилась на 4.1 мм ($p < 0.001$) и 2.8 мм ($p < 0.01$). Длина остевых волос на хребте, боку и огулке увеличилась на 8.1; 7.8 и 7.8 мм ($p < 0.001$) соответственно. Установлено увеличение длины пуховых волос на всех участках шкурок в сравнении с образцами контрольной группы – на 13.0, 4.5 и 6.3 мм ($p < 0.001$). Зафиксировано увеличение толщины дермы в области хребта на 0.71 мм ($p < 0.001$). Установленные изменения в строении кожи и волоса у взрослых самок соболей под воздействием препарата Флоравит® положительно повлияли на качество волосного покрова. Таким образом, биорегулятор Флоравит® участвует в процессе адаптации организма соболей к воздействию факторов внешней среды.

Ключевые слова: соболь; *Martes zibellina*; препарат Флоравит®; морфологические исследования; волосной покров; дерма; качество опушения.

Influence of the biologically active dietary supplement Floravit® on the skin and hair structure in sable (*Martes zibellina*)

N.N. Loenko¹✉, I.E. Chernova², T.S. Kunitsina³

¹ Scientific Research Institute of Fur-Bearing Animal and Rabbit Breeding Industry n.a. V.A. Afanasyev, Moscow Region, Rodniki, Russia

² Federal State Unitary Enterprise "Russkii Sobol", Moscow Region, Zverosovkhoz, Russia

³ Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology n.a. K.I. Skryabin, Moscow, Russia

It is important to search for new highly effective multi-component compounds that are able to influence several of animals' homeostasis systems simultaneously to improve the physiological adaptation of fur animals to different conditions of nutrition. This is the function of the feed additive Floravit® – a natural bioregulator. The compound is a combination of biologically active ingredients produced by the mycelial fungus *Fusarium sambucinum*. Studied was the effect of Floravit® on the structure of the skin and hair in adult female sable (*Martes zibellina*). The scientific and economic experiment was conducted at the JSC "Plemzavod Pushkinskiy" in the Moscow Region during the period of winter fur formation in October–November. The study of the morphological structure of the hair and skin cover was carried out in the chine, side and rump topographical areas. The structure of the guard hairs in the main topographical areas was examined on a scanning electron microscope. The experiment showed that administration of Floravit® *per os* to adult female sable at a dose of 1.0 ml per head per day throughout the period of winter pelt formation in October–November has an influence on the morphological structure of all the categories of hair on all topographic pelt areas. Animals in the test group exposed to Floravit® exhibited an increase in guide hair length on the chine and side, when compared to controls, by 4.1 mm ($p < 0.001$) and by 2.8 mm ($p < 0.01$), respectively. The length of guard hair on the chine, side and rump increased by 8.1, 7.8 and 7.8 mm ($p < 0.001$), respectively. An increase in down hair length was recorded in all areas of the pelt, when compared to controls, by 13.0, 4.5 and 6.3 mm ($p < 0.001$). An increase in dermal thickness was recorded in the chine area by 0.7 mm ($p < 0.001$). The specified changes in the skin and hair structure in sable

adult females after using Floravit® have shown a positive influence on the quality of hair cover. As a result, bioregulator Floravit® takes part in the adaptation process of the sable organism to external factors.

Key words: sable; *Martes zibellina*; compound Floravit®; morphological study; hair coating; derma; pelt quality.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Лоечко Н.Н., Чернова И.Е., Куницына Т.С. Влияние биологически активного препарата Флоравит® на строение кожи и волоса у соболей (*Martes zibellina*). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(2):256-260. DOI 10.18699/VJ18.356

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Loenko N.N., Chernova I.E., Kunitsina T.S. Influence of the biologically active dietary supplement Floravit® on the skin and hair structure in sable (*Martes zibellina*). Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(2):256-260. DOI 10.18699/VJ18.356 (in Russian)

В настоящее время ведется интенсивный поиск новых высокоэффективных препаратов для повышения физиологической адаптации пушных зверей к различным средовым условиям (Шумилина и др., 2007; Бекетов и др., 2009; Баранцева, 2010).

Подобным действием обладает природный биорегулятор – кормовая добавка Флоравит® – многокомпонентный высокоэффективный препарат, который воздействует сразу на несколько систем гомеостаза животного. Флоравит® оказывает влияние на функционально активные элементы эпидермиса и дермы. Препарат представляет собой композицию биологически активных веществ, продуцируемых мицелиальным грибом *Fusarium sambucinum*, в его состав входят: антиоксиданты, ферменты, полисахариды, комплекс микроэлементов, регуляторные пептиды и низкомолекулярные белки в сверхмалых дозах, что, видимо, обеспечивает многостороннее действие препарата на гомеостаз животного (Григораш и др., 2002, 2009; Богданов и др., 2012).

В звероводстве в результате проведенных исследований установлено, что включение биологически активного препарата Флоравит® в рационы норок и соболей в периоды воспроизводства и выращивания молодняка положительно влияет на их продуктивность (Пучков, 2008; Лоечко и др., 2010, 2012). Включение добавки Флоравит® в рацион молодняка соболей в период формирования зимнего волосяного покрова в августе–октябре улучшает качественные показатели шкурки соболей: положительно влияет на густоту волосяного покрова и длину волос (Лоечко и др., 2016).

Цель данной работы состояла в изучении действия биологически активного препарата Флоравит® на морфологическое строение кожи и волоса у взрослых самок соболей в период формирования зимнего опушения.

Материалы и методы

Работа проводилась на соболиной ферме специализированного звероводческого хозяйства «Пушкинский» Московской области. Средовые условия для зверей – кормление, содержание, проведение зооветеринарных мероприятий – отвечали технологическим стандартам, разработанным специально для клеточного соболеводства (Казакова и др., 1986).

Контрольная и экспериментальная группы животных были сформированы из взрослых половозрелых самок соболей стандартного генотипа (+/+) в возрасте от 3 до 11 лет, прошедших бонитировку и отобранных по качеству

опушения на племенные цели. В опыте использовано 19 самок соболей, разделенных на две группы, выравненные по возрасту зверей: в I группе (контрольной) – 10 и во II (опытной) – 9 голов. В период формирования зимнего волосяного покрова все животные, как в эксперименте, так и в контроле, получали *ad lib* полноценный корм согласно рекомендуемым нормам. Содержание переваримых протеина, жира и углеводов в рационе в сентябре–ноябре составило 7.2, 4.7 и 5.83 г на 100 ккал обменной энергии. Экспериментальная группа с 16 октября по 18 ноября получала к основному рациону дополнительно *per os* биологически активный препарат Флоравит® из расчета 1.0 мл на голову в сутки. После убоя зверей и первичной обработки шкурки были комиссионно оценены по ГОСТ 27571-87 (1987).

Изучение морфологического строения волосяного и кожного покровов проводили на основных топографических участках шкурок: хребте, боку и огулке.

Всего исследовано 860 образцов волос, из них направляющих 60, остевых 200, пуховых 600 волос.

Толщину кожной ткани определяли с помощью толщинометра Мейснера с точностью до 0.1 мм. Длину волос каждой категории (направляющие, остевые и пуховые) измеряли в расправленном состоянии с точностью до 0.1 см. Определение толщины волос различных категорий проводили с помощью микроскопа монокулярного биологического серии Biolam Lomo и окуляр-микрометра. Толщину направляющих и остевых волос определяли в гране, а пуховых – в стержне волоса.

Структуру остевых волос на основных топографических участках исследовали на сканирующем электронном микроскопе JEM-1011.

Данные экспериментов обработаны статистически на персональном компьютере с использованием программы Microsoft Excel и критерия достоверности Стьюдента.

Результаты

Анализ данных показал (табл. 1), что в контрольной группе животных толщина дермы на разных топографических участках шкурки – хребте, боковой части шкурки и огулке – одинаковая. Под воздействием препарата Флоравит® на боках и огулке толщина дермы в опытной группе не изменилась, а по хребту зафиксировано ее достоверное увеличение на 0.71 мм ($p < 0.001$).

Из приведенных в табл. 2 данных видно, что под воздействием препарата Флоравит® произошло изменение в длине волос всех категорий.

Table 1. Changes in dermis thickness under the influence of the dietary supplement Floravit®, mm

Groups	Number of measurements	Pelt topographic location					
		Chine		Side		Rump	
		X±m _x	C _v , %	X±m _x	C _v , %	X±m _x	C _v , %
I (control)	100	0.99±0.1	33.3	1.01±0.1	20.8	1.01±0.1	20.8
II (test)	100	1.7±0.1***	16.5	1.16±0.1	25.9	0.98±0.1	27.6

*** *p* < 0.001.

Table 2. Changes in the hair length of different categories under the influence of the dietary supplement Floravit® (mm)

Groups	Pelt area	Hair category					
		Guide <i>n</i> = 30		Guard <i>n</i> = 100		Down <i>n</i> = 300	
		X±m _x	C _v , %	X±m _x	C _v , %	X±m _x	C _v , %
I (control)	Chine	42.2±0.7	11.4	33.0±0.6	13.3	26.8±0.5	14.5
	Side	48.2±0.8	11.6	33.7±0.7	11.9	27.4±0.5	12.4
	Rump	52.4±0.8	10.7	32.6±0.7	14.1	25.8±0.5	13.1
II (test)	Chine	46.3±0.6***	9.9	41.1±0.6***	10.2	39.8±0.5***	9.8
	Side	51.0±0.6**	8.6	41.5±0.5***	9.4	31.9±0.4***	10.7
	Rump	52.8±0.6	8.3	40.4±0.6***	10.0	32.1±0.5***	11.8

** *p* < 0.01; *** *p* < 0.001; *n* – number of measurements.

Table 3. Change in hair thickness in different categories under the influence of the biologically active dietary supplement Floravit®, μm

Groups	Pelt area	Hair category					
		Guide <i>n</i> = 30		Guard <i>n</i> = 100		Down <i>n</i> = 300	
		X±m _x	C _v , %	X±m _x	C _v , %	X±m _x	C _v , %
I (control)	Chine	93.8±0.25	1.5	85.2±0.16	1.9	15.2±0.07	7.9
	Side	88.3±0.23	1.4	73.2±0.14	1.9	14.6±0.07	8.3
	Rump	72.6±0.23	1.7	60.1±0.15	2.6	14.6±0.07	3.5
II (test)	Chine	114.7±0.39***	1.9	87.6±0.18***	2.1	15.8±0.07***	8.2
	Side	90.7±0.38***	2.3	89.7±0.16***	1.8	24.4±0.8***	5.7
	Rump	90.0±0.25***	1.5	60.3±0.19	3.2	16.4±0.0***	3.0

****p* < 0.001.

В опытной группе животных под воздействием Флоравита® длина направляющих волос на хребте и боку в сравнении с контролем увеличилась на 4.1 мм (*p* < 0.001) и 2.8 мм (*p* < 0.01) соответственно. На огулке направляющий волос на препарат не отреагировал: длина волоса и в опыте, и в контроле практически одинаковая.

Длина остевых волос на хребте, боку и огулке увеличилась на 8.1, 7.8 и 7.8 мм (*p* < 0.001) соответственно.

Зафиксировано увеличение длины пуховых волос на всех участках шкурок в сравнении с образцами контрольной группы: 13.0, 4.5 и 6.3 мм (*p* < 0.001).

Результаты согласуются с ранее полученными данными при включении препарата Флоравит® в рацион молодняка соболей в период формирования зимнего волосяного покрова в августе–октябре (Лоенко и др., 2016). Прово-

дкация биологически активным препаратом Флоравит® выявила изменение в толщине волос всех трех категорий (табл. 3).

Как видно из данных табл. 3, под воздействием препарата Флоравит® толщина направляющих волос на боку, огулке и хребте у самок опытной группы увеличилась на 2.4, 17.4 и 20.9 мкм в сравнении с контролем (*p* < 0.001).

Увеличение толщины остевых волос на хребте и боку составило 2.4–16.5 мкм (*p* < 0.001); пуховых волос на хребте, огулке и боку – 0.6, 9.8 и 1.8 мкм (*p* < 0.001) соответственно. Толщина остевого волоса на огулке под воздействием препарата Флоравит® не изменилась.

Рис. 1 и 2 (микрофотографии остевых волос) дополняют и иллюстрируют представленную выше картину изменений в структуре опушения самок соболей под воз-

действием биологически активного препарата Флоравит®.

В опытной группе животных текстура чешуек ости гладкая, они плотно прилегают друг к другу и, в отличие от контрольной группы, нет выраженного отслоения. Уплотненность чешуйки характеризует гладкость волоса и блеск (см. рис. 1, б и 2, б). В результате отслоения и неплотного прилегания чешуек волос теряет блеск, становится хрупким и ломким (см. рис. 1, а и 2, а).

При изучении строения сердцевинных остевых волос животных опытной группы обнаружено, что она четко структурирована и имеет воздушные полости, которые представляют собой неравноячеистую гладкую структуру (см. рис. 2, б). В контрольной группе сердцевина волос четко структурирована и имеет более крупные ячейки (см. рис. 2, а).

Установленные изменения в строении кожи и волоса у взрослых самок соболей под воздействием препарата Флоравит® положительно повлияли на качество волосяного покрова. Комплексный показатель оценки шкурки – зачет по качеству (ГОСТ 7571-87, 1987) – в опытной группе был выше на 1.2 % (75.0 ± 3.4 против 73.8 ± 3.1 %), что согласуется с ранее полученными данными по качеству шкурки при включении добавки Флоравит® в рацион молодняка соболей (Пучков, 2008; Лоенко и др., 2016).

Закключение

Представленная экспериментальная работа по использованию биопрепарата Флоравит® в период формирования зимнего опушения у соболей показывает, что большинство хозяйственно важных признаков животных развивается на сложной генетической основе, а их фенотипическое проявление зависит от взаимоотношения генотип–среда. Полученные при исследовании данные позволяют сделать вывод, что введение в рацион самок соболей препарата Флоравит® в период формирования зимнего волосяного покрова оказывает биорегулирующее влияние на морфологическую структуру всех категорий волос на топографических участках шкурки, а также на толщину дермы в области хребта. Это свидетельствует о возможности применения препарата Флоравит®

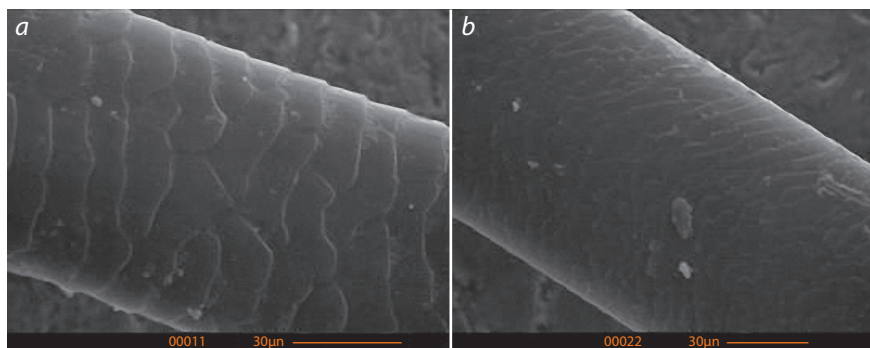


Fig. 1. Cuticle structure of guard hair in the rump area: (a) control, (b) test.

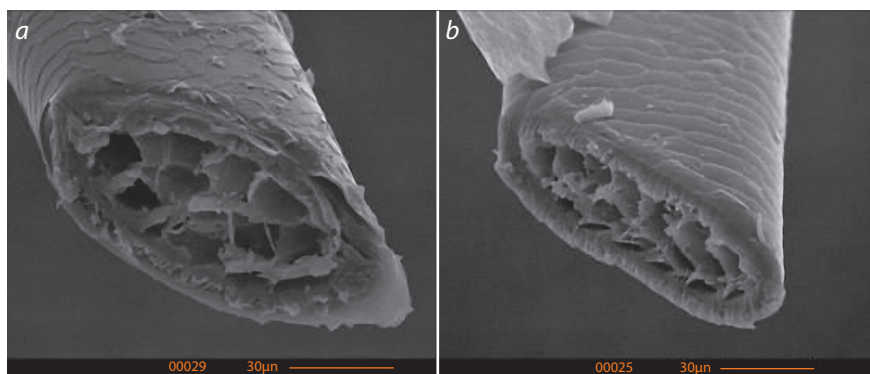


Fig. 2. Cross section of a side guard hair: (a) control, (b) test.

для повышения устойчивости организма животных к воздействию факторов внешней среды, в частности к различным условиям питания, что способствует более полной реализации их генетического потенциала.

Acknowledgments

This work was supported by the State Budget, project 115021770031.

The authors are grateful to Plemzavod Pushkinskiy Farm (Russkiy Sobol Company) for providing facilities and resources and to the staff of Gella-Pharma Company for advice.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Barantseva O.V. Influence of the keratin-containing dietary supplement Keratopeptid on hair thickness in young minks. *Veterinarnaya meditsina = Veterinary Medicine*. 2010;5(6):52-54. (in Russian)
- Beketov S.V., Toporova L.V., Toporova I.V., Plugina I.V. Environmental factors (food and microelement supply) and body weight in farm-bred arctic fox (*Alopex lagopus* Linnaeus, 1758) males. *Informatsionnyy vestnik VOGiS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeders*. 2009;13(3):612-623. (in Russian)
- Bogdanov V.V., Fatkulina E.F., Grigorash A.I., Yamskova V.P., Yamskov I.A. New-generation bio-regulators extracted from *Fusarium sambucinum* culture medium. *Sovremennaya mikologiya v Rossii. Materialy 3-go S'ezda mikologov Rossii [Modern mycology in Russia. Proceedings of the 3rd Congress of Russian Mycologists]*. Moscow: National Mycology Academy Publ., 2012;3:369. (in Russian)
- Grigorash A.I., Maklanov A.I., Memoranskaya A.S., Feofilova E.P., Okunev O.N. Sposob polucheniya biologicheskii aktivnoy dobavki k pishche (varianty) [Method of obtaining biologically active dietary supplements, (options)]. Patent RF No. 2235481, priority on 02.11.2002. (in Russian)

- Grigorash A.I., Vorobyov G.I., Kudryavtsev A.E., Loenko N.N., Pogorelskaya L.V., Bredikhina N.A. Broad-range bioenergetic and metabolism-regulating agents. *Immunologiya. Allergologiya. Infektologiya* = Immunology. Allergology. Infectology. 2009;2:171. (in Russian)
- Kazakova G.P., Snutko E.G., Gladilov Yu.I., Pavliuchenko S.V., Kulichkov B.A., Sergeev E.G., Aulova S.V. *Tekhnologiya proizvodstva shkurok soboley* [Sable pelt production technologies]. Moscow: RSFSR State Agriculture Committee, 1986. (in Russian)
- Loenko N.N., Chernova I.E., Krovina E.V. Using the dietary supplement Floravit® for improving pelt quality in young sables. *Krolikovodstvo i zverovodstvo* = Rabbit and Fur-Bearing Animal Breeding. 2016;2:5-7. (in Russian)
- Loenko N.N., Chernova I.E., Minin M.S. Dietary supplement Floravit® in female sable diets. *Materialy Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii "Nauchnye osnovy proizvodstva i obespecheniya kachestva biologicheskikh preparatov dlya APK"* [Proceedings of the International Research and Practical Conference "Scientific bases of the production and quality control of biological formulae for the agroindustrial complex", December 5–7]. Shchelkovo, 2012;461–463. (in Russian)
- Loenko N.N., Chernova I.E., Puchkov A.V. Using biomass extract from the fungus *Fusarium sambucinum* in sable diets. *Krolikovodstvo i zverovodstvo* = Rabbit and Fur-Bearing Animal Breeding. 2010;6: 6-8. (in Russian)
- Puchkov A.V. The influence of biomass extract from fungus *Fusarium sambucinum* on growth and pelt quality in young sables. *Materialy nauchno-prakticheskoy konferentsii "Vavilovskie chteniya 2008"* 26–27 noyabrya 2008 [Proceedings of the International Research and Practical Conference "Vavilov Readings 2008", November 26–27, 2008]. Saratov, 2008;290–292. (in Russian)
- Shumilina N.N., Chekalova T.M., Mitrofanova M.V. Effect of mutations affecting fur coat colour on hairiness quality. *Informatsionnyy vestnik VOGiS* = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeders. 2007;11(1):131–138. (in Russian)
- State Standard 27571-87. Raw sable skins obtained by hunting. Specifications. Moscow: Izdatel'stvo Standartov Publ., 1987. (in Russian)



Изменение экспрессии актин-связывающих белков в почке при дегидратации

И.И. Хегай

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Актин относится к основным структурным белкам эукариотов. В отличие от мышечного альфа-актина бета-актин экспрессируется во всех типах клеток. В немышечных клетках наблюдается постоянная реорганизация актинового цитоскелета. Фибриллярный актин, собранный из глобулярных мономеров, взаимодействует с актин-связывающими белками. Альфа-актинин формирует поперечные шивки в актиновой фибриллярной сети, а также концентрируется в области фокальных контактов. Тропомиозин относится к регуляторным компонентам бета-актина и за счет продольной укладки молекулы в бороздку актинового микрофиламента стереохимически экранирует сайты других актин-связывающих белков. Важнейшей функцией актинового цитоскелета рассматривается участие в транспортировке везикул с аквапоринами второго типа в главных клетках эпителия собирательных трубок мозгового вещества почки. Вазопрессин стимулирует выход тетрамеров аквапоринов из цитоплазматических депо в апикальную плазматическую мембрану. Участие и роль отдельных белков цитоскелета в процессе встраивания аквапоринов и организации дополнительных пор для воды слабо изучено в молекулярной физиологии почки. Исследована реактивность белков актинового цитоскелета на осморегулирующее действие продолжительной гидратации и дегидратации у крыс в зависимости от наличия или отсутствия в геноме активно экспрессирующегося гена вазопрессина. Нами установлено, что эффективность концентрирующей системы почки, регулируемой вазопрессином, зависит от экспрессии актин-связывающих белков в мозговом веществе почки. На фоне стабильного уровня внутриклеточного бета-актина наблюдается изменение экспрессии альфа-актинина и тропомиозина. Дегидратация организма сопровождается существенным снижением альфа-актинина. В отсутствие вазопрессина снижение альфа-актинина имеет меньшую амплитуду. Наличие в геноме нормального гена вазопрессина, независимо от транзитного уровня экспрессии и секреции гормона, является фактором более низкого тропомиозина в почке. Наиболее вероятным молекулярным механизмом изменения экспрессии генов альфа-актинина и тропомиозина может быть трансдукция V2-опосредованного гормонального сигнала вазопрессина на протеинкиназу A, фосфорилирование цАМФ-респонсивного транскрипционного фактора CREB и внутриядерное взаимодействие CREB с генными CRE-сайтами чувствительности к нему.

Ключевые слова: вазопрессин; почка; концентрирующая система; дегидратация; актиновый цитоскелет; вестерн-иммуноблоттинг; бета-актин; альфа-актинин; тропомиозин.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Хегай И.И. Изменение экспрессии актин-связывающих белков в почке при дегидратации. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(2):261-264. DOI 10.18699/VJ18.357

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Khegay I.I. Changing of expression actin-binding proteins in the kidney under dehydration. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(2):261-264. DOI 10.18699/VJ18.357 (in Russian)

Received 16.08.2017
Accepted for publication 24.10.2017
© AUTHOR, 2018

✉ e-mail: khegay@bionet.nsc.ru

Changing of expression actin-binding proteins in the kidney under dehydration

I.I. Khegay

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Actin is related to main structural proteins in eukaryotes. In opposite to muscle alpha-actin, beta-actin is expressing in all types of cells. The constant reorganization of actin cytoskeleton takes place in non-muscle cells. Fibrillar actin, organized by globular monomers, interacts with the actin-binding proteins. Alpha-actinin forms a transverse links in actin fibrillar network, as well as concentrates in the fields of focal contacts. Tropomyosin is related to regulatory components of beta-actin, and due to the expense of longitudinal localization of the molecule in the groove of actin microfilament, stereochemically shields the sites of other actin-binding proteins. The most important function of actin cytoskeleton is the participation in the transportation of vesicles with aquaporins of second type in principal cells of an epithelium of collecting ducts in renal medulla. Vasopressin is stimulating the release of aquaporin tetramers from cytoplasmic store to apical plasmatic membrane. The participation and role of separate cytoskeleton proteins in the process of aquaporin trafficking and forming additional pores for water stays a poorly studied place in the molecular physiology of kidney. We explored the osmoregulatory action of prolonged hydration and dehydration on the protein composition of actin cytoskeleton in rats depending on the presence or absence of the actively expressing vasopressin gene in the genome. We found that the efficiency of the renal concentrating system, controlled by vasopressin, depends on expression of actin-binding proteins in the renal medulla. On the background of a stable level of inner cellular beta-actin, a change of expression an alpha-actinin and tropomyosin is observed. Dehydration of the organism is accompanied by essential reducing of alpha-actinin. In the absence of vasopressin, reduction of alpha-actinin has a smaller amplitude. The presence of the normal vasopressin gene in the genome, regardless of transitory expression level and secretion of hormone, is a factor of lower tropomyosin in the kidney. The most probable molecular mechanism of changing the expression of the genes for alpha-actinin and tropomyosin is transduction of the V2-mediated vasopressin hormonal signal to protein kinase A, phosphorylation of the cAMP-responsible transcriptional factor CREB, and nuclear CREB interaction with gene CRE sites sensitive to it.

Key words: vasopressin; kidney; renal concentrating system; dehydration; actin cytoskeleton; western-immunoblotting; beta-actin; alpha-actinin; tropomyosin.

В соматических клетках эукариотов актин составляет наибольшую долю в общей массе фракционируемых белков. В отличие от альфа-изоформы, характерной для мышечной ткани, бета-актин экспрессируется во всех типах клеток и относится к ключевым структурным белкам цитоскелета. Внутриклеточные процессы обычно сопровождаются реорганизацией цитоплазматического актина путем транзитного перехода глобулярных мономеров в фибриллярную форму (Dominguez, Holmes, 2011). Актиновые фибриллы собраны в молекулярную сеть с различной плотностью и протяженностью тяжей, контактирующую со всеми органеллами и внешней мембраной. В цитоплазме немuscularных клеток основной формой организации актиновых фибрилл являются микрофиламенты. Помимо актина, в состав микрофиламентов входит целый ряд актин-связывающих белков, участвующих в реализации разных функций цитоскелета. Прикрепляющаяся по касательной к фибриллярному актину молекула альфа-актинина представляет собой линейный гомодимер из противоположно ориентированных первичных пептидов размером 110 кДа (Ribeiro et al., 2014; Seret et al., 2015). Своими концами альфа-актинин формирует поперечные сшивки между актиновыми фибриллами, а также концентрируется в области фокальных контактов и местах прикрепления микрофиламентов к плазматической мембране (Sjoblom et al., 2008). Альфа-актинин относится к структурным компонентам фибриллярной сети.

Молекула тропомиозина имеет форму спирали из двух скрученных одинаково ориентированных полипептидов, каждый весом около 40 кДа. Тропомиозин локализуется в бороздке, образованной двойной спиралью актина, и перекрывает в продольном направлении около семи мономеров актина. Взаимодействие тропомиозина с актином относительно слабое и осуществляется путем физического переплетения обеих цепочек (Smillie, 1996). Исходя из характера взаимодействия и локализации, тропомиозин, в отличие от альфа-актинина, выполняет функцию белка-регулятора сократительных процессов в микрофибриллах, закрывая в состоянии покоя участки взаимодействия с другими актин-связывающими белками. Сети микрофиламентов, связанных с сократительными белками, формируют стресс-фибриллы, участвующие в клеточной локомоции и перемещении органелл. Важнейшая функция актинового цитоскелета в почке – участие в транспорте везикул с аквапоринами-2 из цитоплазматического депо на апикальную мембрану в главных клетках эпителия собирательных трубок мозгового вещества почки, активируемой и регулируемой вазопрессинном (Knepper, 1997).

Гормональное действие вазопрессина в мозговом веществе почки сопровождается активацией рецепторов V2 типа и трансдукцией внутриклеточного сигнала на эффекторные структуры, непосредственно осуществляющие повышение водной проницаемости в собирательных трубках. Ключевой элемент эффекторного звена реакции на вазопрессин представляют аквапорины второго типа (AQP2), встраивающиеся в апикальную мембрану главных клеток собирательных трубок и контактирующие с просветом почечного канальца. В состоянии физиологического покоя молекулы AQP2 находятся преимущественно в депонированном виде в составе мембран цитоплазма-

тических везикул. Вазопрессин стимулирует быстрый выход везикул наружу, встраивание готовых тетрамеров резервных аквапоринов в апикальную клеточную мембрану и формирование дополнительных пор для воды. Участие и роль отдельных белковых компонентов актинового цитоскелета в реализации этого процесса остаются в значительной мере неисследованными в молекулярной физиологии почки. Нами предпринято исследование экспрессии альфа-актинина, тропомиозина и бета-актина в мозговом веществе почки в условиях продолжительного экспериментального ограничения потребления воды.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на крысах линии WAG с нормальной регуляцией водно-электролитного обмена и мутантной линии Brattleboro с зафиксированным в геноме неэкспрессирующимся геном вазопрессина вследствие делеции со сдвигом рамки считывания (Schmale, Richter, 1984). В контрольной группе в течение трех суток осуществляли распаивание крыс 4 % раствором сахарозы и гидратацию организма, используя данный раствор как единственный источник энергоресурсов. Альтернативное состояние дегидратации вызывали водной депривацией крыс в течение трех суток (употребление в пищу только сухого корма). Уровень осмотического концентрирования оценивали по осмоляльности экскретируемой мочи. Мозговое вещество почки диссектировали из ткани сосочка, отделяя его от корковой зоны сверху и удаляя снизу кончик, контактирующий с почечной лоханкой. Осмоляльность (мОсм/кг H₂O) измеряли криоскопическим методом, основанным на зависимости температуры кристаллизации воды от концентрации осмотически активных веществ (Гинецкий и др., 1962). Все процедуры выполняли в соответствии с принятыми «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» и Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации о гуманном отношении к животным. Исследовано по шесть крыс из каждой линии. Бета-актин и актин-связывающие белки определяли методом иммуноблоттинга. Предварительно проводили электрофоретическое разделение в 10 % полиакриламидном геле по (Laemmli, 1970) белков, экстрагированных из гомогенатов мозгового вещества почки. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли в буфере следующего состава: 25 мМ трис, 192 мМ глицин, 20 % метанол, pH 8.3. Блокирование неспецифической сорбции и инкубацию с антителами делали в фосфатном буфере pH 7.2, содержащем 0.05 % твин 20, 0.1 % азид натрия, 5 % обезжиренное молоко. Для иммунодетекции использовали первичные кроличьи поликлональные антитела и, в качестве вторичных, антикроличьи антитела козы, конъюгированные с пероксидазой (Sigma-Aldrich). Количественная обработка белковых полос выполнена на базе пакета программ Band Leader 3.00. Оценка достоверности различий проведена с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты

Данные, характеризующие концентрирующую функцию почки, представлены в табл. 1. При распаивании 4 % раствором сахарозы происходит избыточное поступление

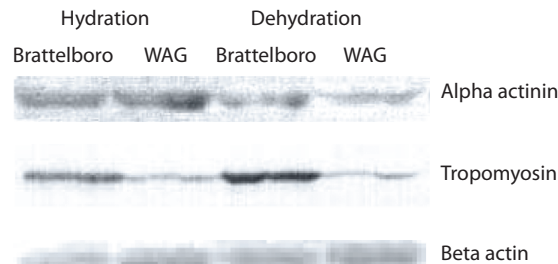
Table 1. Osmolality of urine excreted after three days of drinking 4% sucrose (hydration) or water deprivation (dehydration)

Rat strain	Hormone	Functional state	
		Hydration	Dehydration
Brattleboro	–	223 ± 18**	797 ± 27***
WAG	Vasopressin	680 ± 73	2970 ± 136

The values are shown in mOsm/kg. Differences between strains significant at ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

воды и гипергидратация внутренней среды. У мутантных крыс Brattleboro, не экспрессирующих ген вазопрессина, в этом состоянии выделяется гипотоничная моча. При ограничении потребления воды, наоборот, животное дегидратируется и наблюдается умеренное концентрирование мочи. У крыс WAG с нормальным геном вазопрессина распаивание сахарозой также сопровождается ослаблением индекса концентрирования, однако трое суток водной депривации действует на данный параметр в обратном направлении и резко увеличивает осмоляльность выводимой мочи до максимума, характерного для крыс. Осмоляльность мочи изменяется прямо пропорционально интенсивности процессов реабсорбции воды, которая, в свою очередь, прямо коррелирует с уровнем вазопрессина в крови. Ранее в аналогичном эксперименте нами установлено, что использованные альтернативные функциональные нагрузки противоположным образом влияют на уровень секреции вазопрессина в кровяное русло.

Реабсорбция воды, регулируемая вазопрессином, локализуется преимущественно в мозговом веществе почки. Основной морфологический элемент мозгового вещества – собирательные трубки. Трансэпителиальный ток воды в собирательных трубках усиливается за счет перераспределения молекул AQP2 из цитоплазмы на апикальную мембрану. Работу по транспортировке аквапоринов выполняют белки актинового цитоскелета. Паттерны экспрессии альфа-актина, тропомиозина и бета-актина продемонстрированы на рисунке. Общий уровень внутриклеточного бета-актина остается стабильным и примерно одинаковым во всех группах исследованных крыс. На этом фоне экспрессия альфа-актина характеризуется большей вариабельностью, в обеих линиях после водной депривации у дегидратированных крыс наблюдается снижение количества этого актин-связывающего белка. Изменение экспрессии в большей степени выражено у крыс линии WAG. Экспрессия тропомиозина имеет более динамичный и отчетливо разнонаправленный характер



Immunochemical detection of actin and actin-binding proteins in the renal medulla of Brattleboro and WAG rat strains after various osmoregulatory tests.

различий между линиями. У крыс Brattleboro в состоянии дегидратации уровень тропомиозина выше, чем у гипергидратированных крыс. У крыс WAG, наоборот, дегидратация сопровождается снижением тропомиозина относительно уровня белка, зафиксированного у гидратированных животных.

Количественные данные по альфа-актину и тропомиозину, полученные в перерасчете относительно бета-актина, представлены в табл. 2. Наиболее достоверные различия между линиями наблюдаются по количеству тропомиозина как у гидратированных, так и у дегидратированных животных. При этом собственно реакция на дегидратацию и гидратацию уступает по амплитуде межлинейным различиям по тропомиозину.

Обсуждение

В тканях, экспрессирующих рецепторы вазопрессина, реализуются два типа различающихся по скорости молекулярных процессов. Физиологическое изменение проницаемости для воды, развивающееся в мозговом веществе почки в течение нескольких минут, происходит вследствие мобилизации предварительно синтезирован-

Table 2. Relative contents of alpha actinin and tropomyosin in the renal medulla of Brattleboro and WAG rats at different states of the osmoregulatory system

Protein	Hydration		Dehydration	
	Brattleboro	WAG	Brattleboro	WAG
Alpha actinin	1.19 ± 0.04 [#]	1.27 ± 0.05 ^{###}	1.03 ± 0.03	0.39 ± 0.07 ^{**}
Tropomyosin	1.98 ± 0.05 [#]	0.82 ± 0.04 ^{****}	2.31 ± 0.11	0.66 ± 0.03 ^{***}

Data are presented with reference to beta actin. Differences between strains significant at ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Differences between the hydrated and dehydrated states significant at [#] $p < 0.05$; ^{###} $p < 0.001$.

ных депонированных аквапоринов и составляет быстрый компонент гормонального эффекта вазопрессина. При продолжительном действии вазопрессина изменяется уровень экспрессии генов для наработки дополнительных тканеспецифических белков, задействованных в поддержании оптимального функционального состояния почки (DiGiovanni et al., 1994). Сравнительный анализ белковых спектров, формирующихся при различной интенсивности экспрессии гена вазопрессина – один из подходов для выявления внутриклеточных механизмов реагирования на вазопрессин. Нами показано, что у крыс WAG, находящихся в альтернативных состояниях гипергидратации и дегидратации, на порядок изменяется уровень секреции вазопрессина из нейрогипофиза в кровь. Вследствие мутации в гене вазопрессина, независимо от использования осморегулирующих воздействий, у крыс Brattleboro вазопрессин не синтезируется и тем более не определяется в крови (Khagai, 2003). Умеренное осмотическое концентрирование, наблюдаемое у крыс Brattleboro в состоянии дегидратации, по-видимому, имеет в своей основе гормональные эффекты окситоцина и минералокортикоидов. У крыс WAG вследствие контроля и регуляции вазопрессином эффективность концентрирующей системы почки в несколько раз выше. Как видно на рисунке и в табл. 2, амплитуда изменений по уровню альфа-актина и тропомиозина у крыс Brattleboro также ниже, чем у WAG. У генетически нормальных крыс WAG сильнее выражена реакция альфа-актина на дегидратацию и существенно снижен уровень тропомиозина. Более низкий тропомиозин наблюдается как у дегидратированных, так и у гидратированных крыс WAG. Эти различия по актин-связывающим белкам устойчиво коррелируют с функциональным состоянием нейросекреторной системы вазопрессина. Одним из наиболее вероятных механизмов изменения экспрессии альфа-актина и тропомиозина под действием вазопрессина является трансляция гормонального сигнала в клеточное ядро через V2-цАМФ-зависимый путь и фосфорилирование протеинкиназой А цАМФ-респонсивного транскрипционного фактора CREB (Mayr, Montminy, 2001). Гены с сайтами чувствительности к нему (CRE-элементы) в регуляторных областях попадают под вазопрессиновый контроль экспрессии. В геноме высших позвоночных зафиксированы сотни тысяч CRE-элементов, в среднем по несколько сайтов на отдельный ген. Однако большинство из них обычно находится в метилированном по цитозину состоянии (Altarejos, Montminy, 2011). Молекулярный анализ регуляторной зоны альфа-актина и тропомиозина является самостоятельной задачей и требует дальнейшего развития экспериментальной базы и методического обоснования.

Таким образом, эффективность концентрирующей системы почки, регулируемой вазопрессином, зависит от состояния актинового цитоскелета. На фоне стабильного уровня внутриклеточного бета-актина наблюдается изменение экспрессии актин-связывающих белков. Дегидратация

организма сопровождается существенным снижением альфа-актина. В отсутствие вазопрессина снижение альфа-актина имеет меньшую амплитуду. Наличие в геноме нормального гена вазопрессина, независимо от транзиторного уровня экспрессии и секреции гормона, относится к факторам более низкого тропомиозина в мозговом веществе почки.

Acknowledgments

This work was supported by State Budgeted Project 0324-2018-0016.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Altarejos J., Montminy M. CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2011;12(3):141-151. DOI 10.1038/nrm3072.
- DiGiovanni S.R., Nielsen S., Christensen E.I., Knepper M.A. Regulation of collecting duct water channel expression by vasopressin in Brattleboro rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994;91(19):8984-8988.
- Dominguez R., Holmes K.C. Actin structure and function. *Annu. Rev. Biophys.* 2011;40:169-186. DOI 10.1146/annurev-biophys-042910-155359.
- Ginetsinski A.G., Vasilyeva V.F., Zaks M.G., Natchin J.V., Sokolova M.M. Methods of investigation of the osmoregulatory system in fish. *Rukovodstvo po metodike issledovaniy fiziologii ryb [Handbook on Methods of Physiological Studies in Fish]*. Moscow: AS USSR Publ., 1962;204-216. (in Russian)
- Khagai I.I. Phenotypic expression of the mutant gene *diabetes insipidus* in rats and criteria of genotyping by phenotype. *Russ. J. Genet.* 2003;39(1):57-60.
- Knepper M.A. Molecular physiology of urinary concentrating mechanism: regulation of aquaporin water channels by vasopressin. *Am. J. Physiol.* 1997;272(1):F3-F12.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-685.
- Mayr B., Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001;2(8):599-609. DOI 10.1038/35085068.
- Ribeiro Ede.A., Pinotsis N., Ghisleni A., Salmazo A., Konarev P.V., Kostan J., Sjoblom B., Schreiner C., Polyansky A.A., Gkoukoulia E.A., Holt M.P., Aachmann F.L., Zagrovic B., Bordignon E., Pirker K.F., Svergun D.I., Gautel M., Djinoovic-Carugo K. The structure and regulation of human muscle α -actinin. *Cell.* 2014;159(6):1447-1460. DOI 10.1016/j.cell.2014.10.056.
- Schmale H., Richter D. Single base deletion in the vasopressin gene is the cause of diabetes insipidus in Brattleboro rats. *Nature.* 1984;308(5961):705-709.
- Seret G., Cañas F., Pougnet-Di Costanzo L., Hanrotel-Saliou C., Jousse-Joulin S., Le Meur Y., Saraux A., Valeri A., Putterman C., Youinou P., Rojas-Villarraga A., Anaya J.M., Renaudineau Y. Anti- α -actinin antibodies are part of the anti-cell membrane antibody spectrum that characterize patients with lupus nephritis. *J. Autoimmun.* 2015;61(1):54-61. DOI 10.1016/j.jaut.2015.05.009.
- Sjoblom B., Salmazo A., Djinoovic-Carugo K. α -Actinin structure and regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* 2008;65(17):2688-2701. DOI 10.1007/s00018-008-8080-8.
- Smillie L.B. Tropomyosin. Ed. M. Barany. *Biochemistry of Smooth Muscle Contraction*. San Diego: Acad. Press, 1996;63-90.



Мутация *yellow* в локусе *agouti* устраняет возрастное повышение экспрессии генов белков, регулирующих окисление жирных кислот в мышцах у мышей

Ю.В. Пискунова¹✉, А.Ю. Казанцева², А.В. Бакланов², Н.М. Бажан^{1, 2}

¹ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Мутация *yellow* в локусе *agouti* (A^y мутация), снижающая активность меланокортиновых рецепторов, с возрастом вызывает гиперфагию, ожирение и диабет второго типа у мышей (A^y мыши). Неизвестно, будут ли у A^y мышей изменения в отдельных звеньях метаболической системы (белый и бурый жир и мышцы) проявляться еще до развития ожирения. Цель работы – измерить у A^y мышей относительную экспрессию генов ключевых белков, регулирующих углеводно-жировой обмен в белом и буром жире и скелетной мускулатуре на этапах развития, предшествующих формированию ожирения. Исследовали мышей линии C57Bl/6J, несущих доминантную аутосомную мутацию A^y (A^y/a мыши), и мышей стандартного генотипа данной линии (a/a мыши, контроль) в трех возрастных группах: 10, 15 и 30 нед. Методом ПЦР в реальном времени измеряли относительный уровень мРНК генов в мышцах: uncoupling protein 3 (*Ucp3*) и carnitine palmitoyl transferase 1b (*Cpt1b*) (окисление СЖК), solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4 (*Slc2a4*) (захват глюкозы); в белом жире: lipoprotein lipase (*Lpl*) (депонирование триглицеридов), hormone-sensitive lipase (*Lipe*) (мобилизация жиров) и *Slc2a4* (захват глюкозы); в буром жире: uncoupling protein 1 (*Ucp1*) (расход энергии). В молодом возрасте (10 нед) у A^y мышей в мышцах была снижена экспрессия *Cpt1b*, в 15 нед у них отсутствовал транзитный пик транскрипции *Cpt1b*, *Ucp3* в мышцах, а также *Lipe* и *Slc2a4* в белом жире, который отмечался у a/a мышей. Снижение транскрипционной активности исследованных генов в скелетных мышцах и белом жире может инициировать развитие меланокортинового ожирения у A^y мышей.

Ключевые слова: мыши линии C57Bl/6J; ПЦР в реальном времени; меланокортиновое ожирение; углеводно-жировой обмен.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Пискунова Ю.В., Казанцева А.Ю., Бакланов А.В., Бажан Н.М. Мутация *yellow* в локусе *agouti* устраняет возрастное повышение экспрессии генов белков, регулирующих окисление жирных кислот в мышцах у мышей. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(2):265-272. DOI 10.18699/VJ18.358

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Piskunova Y.V., Kazantseva A.Y., Baklanov A.V., Bazhan N.M. Mutation *yellow* in *agouti* loci prevents age-related increase of skeletal muscle genes regulating free fatty acids oxidation. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(2):265-272. DOI 10.18699/VJ18.358 (in Russian)

Mutation *yellow* in *agouti* loci prevents age-related increase of skeletal muscle genes regulating free fatty acids oxidation

Y.V. Piskunova¹✉, A.Y. Kazantseva², A.V. Baklanov², N.M. Bazhan^{1, 2}

¹ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

² Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

The lethal *yellow* mutation in *agouti* loci (A^y mutation) reduces the activity of melanocortin (MC) receptors and causes hyperphagia, obesity and type two diabetes mellitus in aging mice (A^y mice). It is unknown if changes in distinct elements of the metabolic system such as white adipose tissue (WAT) and brown adipose tissue (BAT), and skeletal muscle will manifest before the development of obesity. The aim of this work was to measure the relative gene expression of key proteins that regulate carbohydrate-lipid metabolism in WAT, BAT and skeletal muscle in A^y mice before the development of obesity. C57Bl/6J mice bearing a dominant autosomal mutation A^y (A^y/a mice) and mice of the standard genotype (a/a mice, control) have been studied in three age groups: 10, 15 and 30 weeks. The relative mRNA level of genes was measured by real-time PCR in skeletal muscles (uncoupling protein 3 (*Ucp3*) and carnitine palmitoyl transferase 1b (*Cpt1b*) (free fatty acids oxidation), solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4 (*Slc2a4*) (glucose uptake)), in WAT lipoprotein lipase (*Lpl*) (triglyceride deposition), hormone-sensitive lipase (*Lipe*) (lipid mobilization), and *Slc2a4* (glucose uptake)), and in BAT: uncoupling protein 1 (*Ucp1*) (energy expenditure). The expression of *Cpt1b* was reduced in young A^y mice (10 weeks), there was no transient peak of transcription of *Cpt1b*, *Ucp3* in skeletal muscle tissue and *Lipe*, *Slc2a4* in WAT in early adult A^y mice (15 weeks), which was noted in a/a mice. Reduction of the transcriptional activity of the studied genes in skeletal muscle and white adipose tissue can initiate the development of melanocortin obesity in A^y mice.

Key words: C57Bl/6J mice; real-time PCR; melanocortin obesity; carbohydrate-lipid metabolism.

В настоящее время резко увеличилось количество людей, страдающих ожирением, при котором повышается риск развития ряда патологий, таких как сахарный диабет 2-го типа (Д2Т), инсульт, инфаркт, гипертония и т.д. (Karpe et al., 2011; Murea et al., 2012). Развитие ожирения может быть обусловлено средовыми и генетическими факторами (Murea et al., 2012). У людей и экспериментальных грызунов встречаются монолокусные формы ожирения, к их числу относится меланокортиновое (МК) ожирение (Waalén, 2014). Его вызывают мутации, нарушающие функцию центральной меланокортиновой системы гипоталамуса, которая регулирует аппетит и расход энергии (Brito et al., 2007; Silva et al., 2014). Исследование путей развития МК ожирения и его купирования актуально, так как в популяции человека среди генетически обусловленных типов ожирения наиболее часто встречается именно меланокортиновый тип (Lee, 2009; Waalén, 2014).

МК система состоит из пяти типов МК рецепторов, которые распространены в мозге (центральная МК система) и периферических тканях (периферическая МК система), их агонистов (меланокортиновые пептиды: аденокортикотропный гормон (АКТГ), все формы меланоцитстимулирующего гормона (МСГ- α , - β и - γ)) и естественных антагонистов (белок Агути, Agouti related protein, AgRP) (Gantz, Fong, 2003). Активация МК рецепторов гипоталамуса вызывает повышение, а блокада – снижение аппетита (Brito et al., 2007; Silva et al., 2014).

Удобной моделью для изучения развития МК ожирения являются мыши, несущие аутосомную спонтанную мутацию *yellow* в локусе *agouti* (A^y мыши) (Wolff et al., 1999a), которая вызывает неконтролируемую и повсеместную экспрессию гена *Agouti* (Michaud et al., 1994). Продукт гена, белок Агути – естественный антагонист МК рецепторов (Макарова, 2002), т.е. мутация снижает активность МК рецепторов во всех клетках организма, это приводит к повышению аппетита (Бажан и др., 2005) и снижению расхода энергии (Michaud et al., 1994). С возрастом у A^y мышей развиваются ожирение и Д2Т, гипергликемия и гиперинсулинемия (Cargill et al., 2004; Бажан и др., 2005). Показано, что МК рецепторы экспрессируются не только в мозге, но и на клетках скелетной мускулатуры и адипоцитах белой жировой ткани (Gantz, Fong, 2003; An et al., 2007), т.е. в тканях, которые участвуют в регуляции метаболизма глюкозы и жиров.

В белой жировой ткани осуществляются захват глюкозы, отложение жиров (липогенез) и их мобилизация (липолиз). Эти процессы находятся под контролем ключевых ферментов: транспортера глюкозы 4-го типа (Глют4), внеклеточной липопротеинлипазы (ЛПЛ) и внутриклеточной гормон-чувствительной липазы (ГЧЛ) соответственно (Carmen, Victor, 2006; Im et al., 2007; Lass et al., 2011). В бурой жировой ткани происходит несократительный термогенез, который регулируется расщепляющим белком 1 (uncoupling protein 1, UCP1), (Cannon, Nedergaard, 2004). В скелетной мускулатуре осуществляются захват и окисление глюкозы и свободных жирных кислот (СЖК). Эти процессы находятся под контролем ключевых ферментов: Глют4, карнитин пальмитоилтрансферазы-1 (CPT1) и расщепляющего белка 3 (uncoupling pro-

tein 3, UCP3) (Bonnefont et al., 2004; Talbot et al., 2004; Im et al., 2007).

В настоящее время достаточно хорошо описан спектр нарушений углеводно-жирового обмена на фоне развитого МК ожирения у A^y мышей. У них на фоне ожирения увеличен размер адипоцитов белого жира (Бажан и др., 2005), снижены экспрессия гена липопротеинлипазы (lipoprotein lipase, *Lpl*) и уровень адипонектина в белом жире, повышен уровень холестерина и лептина в плазме крови по сравнению с контрольными мышами того же возраста, у которых нет ожирения (Chiu et al., 2004). Поскольку МК рецепторы обнаружены в белом и буром жире и мышцах – тканях, влияющих на обмен жиров и углеводов, можно предположить, что нарушения обмена энергии у мышей с мутацией A^y , которая снижает активность МК рецепторов, может начинаться задолго до манифестации ожирения. В доступной литературе мы не встретили работ, посвященных изучению динамики возрастных изменений экспрессии генов белков, участвующих в регуляции процессов обмена энергии в периферических тканях, у мышей с доминантной мутацией в локусе *agouti*.

Цель данной работы заключалась в изучении изменений относительной экспрессии генов ключевых белков в белой жировой ткани: ЛПЛ *Lpl*, ГЧЛ *Lipe*, Глют4 *Slc2a4*; в бурой жировой ткани: UCP1 *Ucp1* и в скелетной мускулатуре: UCP3 *Ucp3*, CPT1 *Cpt1b*, Глют4 *Slc2a4* у A^y мышей по мере развития ожирения.

Исследование показало, что в молодом возрасте (10 нед) задолго до манифестации ожирения у A^y мышей в скелетных мышцах была снижена экспрессия гена *Cpt1b*, вовлеченного в окисление жирных кислот, в раннем взрослом возрасте (15 нед) у них отсутствовали транзитный пик транскрипции генов белков, регулирующих окисление СЖК в мышцах (*Cpt1b* и *Ucp3*), гидролиз триглицеридов (*Lipe*) и захват глюкозы (*Slc2a4*) в белом жире. Снижение транскрипционной активности исследованных генов в мышцах и белом жире может инициировать развитие меланокортинового ожирения.

Материалы и методы

Этическая политика. Все эксперименты выполнены в соответствии с Европейской конвенцией об охране позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Совет Европы, протокол № 123, Страсбург, 1985 г.), и российских национальных инструкций по уходу и использованию лабораторных животных. Протоколы одобрены Комиссией по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН (протокол № 35 от 26 октября 2016 г.). Были предприняты все усилия для сведения к минимуму страдания животных и сокращения числа используемых животных.

Животные и протокол эксперимента. Работу проводили на мышках, содержащихся в виварии Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск) в условиях постоянного светового режима (12С:12Т) и свободного доступа к воде и пище («Ассортимент-Агро», Тураково, Московская область, Россия) при температуре $22 \pm 2^\circ \text{C}$. В эксперимент брали самцов мышей линии C57Bl/6J, гетерозиготных по доминантной мутации *yellow* локуса *agouti* (генотип A^y/a). Контролем служили мыши-сиссы

стандартного генотипа данной линии (a/a мыши). В возрасте 28 дней самцов отсаживали от матери и помещали в клетки по одному. Мышей случайным образом определяли в три возрастные группы: 10, 15 и 30 нед. Эти возрасты соответствуют этапам развития ожирения у A^y/a мышей: 10 нед – отсутствуют различия в массе тела между генотипами, 15 нед – масса тела у A^y/a мышей незначительно, но достоверно превышает таковую у a/a мышей и 30 нед – у A^y/a мышей развивается ожирение и Д2Т (гиперинсулинемия и гипергликемия) (Бажан и др., 2005). В каждой группе было по пять-семь животных каждого генотипа. Мышей подвергали декапитации без использования анестезии. Сбор крови осуществляли в пробирки, обработанные ЭДТА, которые сразу помещали на лед. Плазму отделяли центрифугированием и хранили при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до проведения анализа. Образцы бедренной мышцы, абдоминального белого жира, меж- и подлопаточного бурого жира после извлечения сразу взвешивали и быстро помещали в жидкий азот для дальнейшего измерения уровня экспрессии генов. Индексы массы белой и бурой жировой ткани рассчитывали как отношение массы жировой ткани к массе тела.

Биохимические показатели крови. Определение концентрации в плазме крови СЖК, триглицеридов (ТГ) и глюкозы проводили с использованием коммерческих наборов: для СЖК и глюкозы – DiaSys Diagnostic Systems GmbH (Хольцхайм, Германия); для ТГ – ЗАО «ДИАКОН-ДС» (Пушино, Россия).

Relative quantification real-time PCR. Выделение суммарной РНК из белой и бурой жировой тканей и скелетной мускулатуры проводили с использованием реагента TRIzol (Ambion, the RNA Company, США), согласно инструкции производителя. Синтез кДНК проводили с помощью обратной транскриптазы MMLV (Promega Corporation, Madison, WI, США) и праймера Oligo-dT («БИОСЦЕТ», Новосибирск, Россия). В пробу вносили 1 мкг общей РНК. Для оценки относительного уровня мРНК *Slc2a4* в белой жировой ткани и скелетной мускулатуре амплификацию фрагментов кДНК методом ПЦР в реальном времени проводили с использованием 5'-нуклеаз на основе флуоресцентных зондов реагентов Applied Biosystems: TaqMan® gene expression assay Mm01245502_m1; TaqMan gene expression Master Mix; TaqMan Endogenous Controls with FAM TM dye label and MGB Mouse beta-actin (АСТВ). Амплификация остальных генов методом ПЦР в реальном времени проводилась с использованием флуоресцентного красителя SYBR Green I и ROX («Синтол», Россия). Праймеры: *Ucp1* (длина фрагмента 143 п. н., sense – 5'-gggcattcagaggcaaatcag-3', antisense – 5'-ctgccacacctccagtcattaag-3') (Nakamura et al., 2013); *Lpl* (длина фрагмента 274 п. н., sense – 5'-tcttgattacacggagtg-3', antisense – 5'-tcttggtgtgtgtccagtg-3') (Yang et al., 2007); *Lipe* (длина фрагмента 162 п. н., sense – 5'-gactcaccgtgactcc-3', antisense – 5'-ctgtctcgttgctgtgta-3') (Ying et al., 2013); *Cpt1b* (длина фрагмента 117 п. н., sense – 5'-ttcaactacacgcatccc-3', antisense – 5'-gccctcatagaccagacc-3') (Kim et al., 2014); *Ucp3* (длина фрагмента 105 п. н., sense – 5'-tgtttactgacaactcccc-3', antisense – 5'-tcatgtatcggtgtttacc-3') (Lee et al., 2013); β -actin (длина фрагмента 142 п. н., sense – 5'-caacgagcggttccgatg-3', antisense – 5'-cactgtgtggcatagagg-3') (Gong et al., 2008). Все

реакции выполнены в объеме пробы 25 мкл в 96-луночных планшетах (MicroAMP, Applied Biosystems®) в амплификаторе ViiA™ 7 (Applied Biosystems®) в соответствии с протоколом ($50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 мин, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 мин, 40 циклов $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 с, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 мин). Осуществляли амплификацию двух репликатов каждой пробы. Уровень мРНК гена в каждой пробе оценивали по пороговому циклу начала флуоресценции и нормировали относительно уровня мРНК гена в одной контрольной пробе (сравнительный метод ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) для мышей обоих генотипов).

Статистическая обработка результатов. Все результаты представлены как среднее $\pm$ ошибка среднего. Статистическую обработку проводили с использованием пакета программ STATISTICA 6.0 (StatSoft). Данные обрабатывали двухфакторным дисперсионным анализом (ANOVA) с главными факторами: «генотип» (A^y/a и a/a) и «возраст» (10, 15 и 30 нед). Для сравнения отдельных групп использовали post-hoc Fisher's LSD test, в некоторых случаях применяли также t -критерий Стьюдента. Различия считали достоверно значимыми при $p < 0.05$.

Результаты

Масса тела, индекс белого абдоминального и бурого меж- и подлопаточного жира

С возрастом масса тела повышалась как у a/a , так и у A^y/a мышей (ANOVA, влияние возраста $F_{2,34} = 315.2$; $p < 0.001$), но у мышей генотипа A^y/a повышение было более выраженным (ANOVA, взаимодействие факторов «генотип» и «возраст» $F_{2,34} = 88.1$; $p < 0.001$). Масса тела была выше у A^y/a мышей (ANOVA, влияние генотипа $F_{1,34} = 126.6$; $p < 0.001$), особенно ярко это проявлялось в возрасте 30 нед, когда она в 1.5 раза достоверно превышала таковую у a/a мышей ($p < 0.001$, post-hoc Fisher's LSD test) (рис. 1, а).

Повышение массы тела у A^y/a мышей ассоциировалось с увеличением доли белого и бурого жира. С возрастом индекс белого жира увеличился как у a/a , так и у A^y/a мышей (ANOVA, влияние возраста $F_{2,32} = 118.7$; $p < 0.001$), у A^y/a мышей это увеличение было более выраженным (ANOVA, взаимодействие факторов «генотип» и «возраст» $F_{2,32} = 56.7$; $p < 0.001$). Индекс белого жира был выше у A^y/a мышей (ANOVA, влияние генотипа $F_{1,32} = 65.8$, $p < 0.001$), наиболее показательным в этом отношении был возраст 30 нед, когда у A^y/a мышей он достоверно превышал таковой у a/a мышей более чем в три раза ($p < 0.001$, post-hoc Fisher's LSD test) (см. рис. 1, б).

С возрастом индекс бурого жира увеличился как у a/a , так и у A^y/a мышей (ANOVA, влияние возраста $F_{2,34} = 35.7$; $p < 0.001$), но у A^y/a мышей увеличение было более выраженным (ANOVA, взаимодействие факторов «генотип» и «возраст» $F_{2,34} = 4.5$; $p < 0.05$). В возрасте 30 нед индекс бурого жира у A^y/a мышей был выше, чем у a/a мышей ($p < 0.01$, post-hoc Fisher's LSD test) (см. рис. 1, в).

Биохимические показатели крови. Уровень ТГ в крови с возрастом повышался только у A^y/a мышей (ANOVA, влияние генотипа $F_{1,30} = 9.8$; $p < 0.01$; возраста $F_{2,32} = 5.6$; $p < 0.01$), у a/a мышей возрастных изменений не обнаружено. Наиболее существенные генотипические различия отмечались в возрасте 30 нед: у A^y/a мышей уровень ТГ

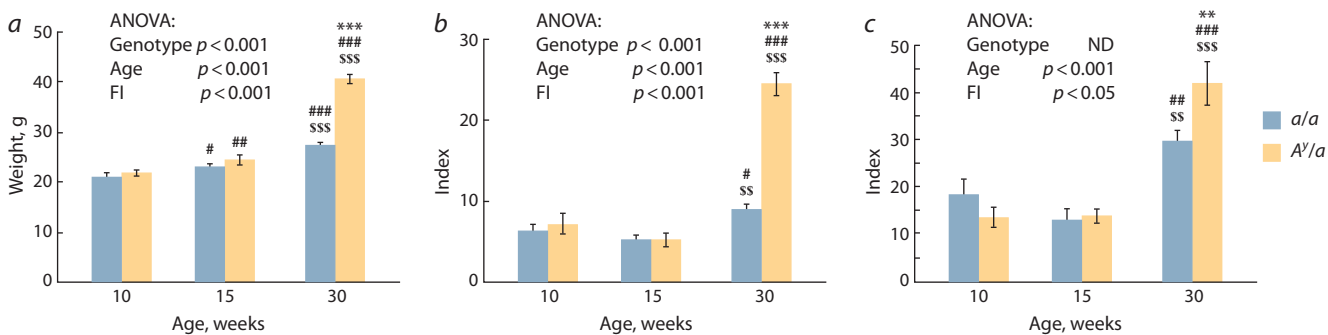


Fig. 1. (a) Body weight, (b) white fat index, and (c) brown fat index in 10, 15, and 30-week old a/a and A^y/a mice.

Here and in Figs. 2–4: ANOVA factors: genotype, age, and factor interaction (FI). The results are shown as mean $\pm$ standard error of the mean.

*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ as compared to a/a mice of the same age;

$p < 0.001$, ## $p < 0.01$, # $p < 0.05$ as compared to 10-week mice of the same genotype (post-hoc Fisher's LSD test);

sss $p < 0.001$, ss $p < 0.01$, s $p < 0.05$ as compared to 15-week mice of the same genotype (post-hoc Fisher's LSD test).

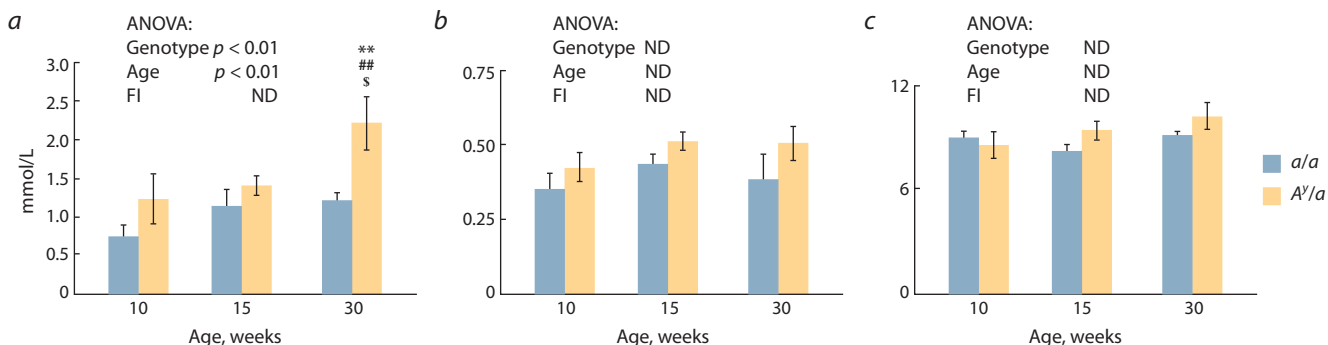


Fig. 2. Levels of (a) TG, (b) FFA, and (c) glucose in blood of 10, 15, and 30-week old a/a and A^y/a mice.

Designations follow Fig. 1.

в крови был выше, чем у a/a мышей, в 1.8 раза ($p < 0.01$, post-hoc Fisher's LSD test) (см. рис. 2, а).

С возрастом концентрация СЖК в плазме крови не изменялась как у a/a , так и у A^y/a мышей. Однако наблюдалось влияние генотипа (ANOVA, влияние генотипа $F_{1,30} = 4.15$; $p < 0.05$) на уровень СЖК в крови. Ни в одной возрастной группе не обнаружено различий между a/a и A^y/a мышами по этому параметру (см. рис. 2, б).

Концентрация глюкозы в крови не изменялась с возрастом как у a/a , так и у A^y/a мышей. Ни в одной возрастной группе не обнаружено различий между a/a и A^y/a мышами по этому параметру (см. рис. 2, в).

Относительный уровень мРНК ключевых генов белков, регулирующих углеводно-жировой обмен

Белая жировая ткань. Уровень мРНК *Lpl* оставался неизменным с возрастом как у a/a , так и у A^y/a мышей. У A^y/a мышей он был ниже, чем у a/a мышей (влияние генотипа $F_{1,29} = 7.1$; $p < 0.01$). Наиболее существенные генотипические различия отмечались в возрасте 30 нед, когда уровень мРНК *Lpl* у A^y/a был в два раза ниже, чем у a/a мышей ($p < 0.01$, post-hoc Fisher's LSD test) (рис. 3, а).

У мышей обоих генотипов уровень мРНК *Lipe* изменялся с возрастом: повышался к возрасту 15 нед, а затем снижался к 30 нед (ANOVA, влияние возраста $F_{2,30} = 30.7$; $p < 0.001$). Однако у A^y/a мышей возрастные изменения

были значительно менее выражены, чем у a/a мышей (ANOVA, взаимодействие факторов «генотип» и «возраст» $F_{2,30} = 3.8$; $p < 0.05$). Если у a/a мышей к 15 нед уровень мРНК *Lipe* повысился в 7.7 раза ($p < 0.001$, post-hoc Fisher's LSD test), то у A^y/a мышей это повышение было недостоверным ($p < 0.1$, post-hoc Fisher's LSD test). Ни в одной возрастной группе не обнаружено различий между a/a и A^y/a мышами по абсолютным значениям уровня мРНК *Lipe* (см. рис. 3, б).

Возрастная динамика уровня мРНК *Slc2a4* совпадала с таковой по уровню мРНК *Lipe*. У мышей обоих генотипов уровень мРНК *Slc2a4* повышался к возрасту 15 нед, а затем снижался к 30 нед (ANOVA, влияние возраста $F_{2,26} = 13.7$; $p < 0.001$). Однако у A^y/a мышей возрастные изменения были значительно менее выражены, чем у a/a мышей (ANOVA, взаимодействие факторов «генотип» и «возраст» $F_{2,26} = 2.7$; $p = 0.08$). Если у a/a мышей к 15 нед уровень мРНК *Slc2a4* повысился в 17 раз ($p < 0.001$, post-hoc Fisher's LSD test), то у A^y/a мышей это повышение было недостоверным ($p < 0.1$, post-hoc Fisher's LSD test). По абсолютным значениям уровня мРНК *Slc2a4* не обнаружено различий между a/a и A^y/a мышами ни в одной возрастной группе (см. рис. 3, в).

Бурая жировая ткань. С возрастом уровень мРНК *Ucp1* снижался как у a/a , так и у A^y/a мышей (ANOVA, влияние возраста $F_{2,31} = 12.4$; $p < 0.001$). Ни в одной воз-

растной группе не было обнаружено различий между a/a и A^y/a мышами по абсолютным значениям этого параметра (см. рис. 3, z).

Скелетная мускулатура. У A^y/a мышей в отличие от a/a мышей уровень мРНК *Slc2a4* снижался с возрастом (ANOVA, взаимодействие факторов «генотип» и «возраст» $F_{2,30} = 3.0$; $p = 0.07$). У A^y/a мышей в возрасте 10 нед уровень мРНК *Slc2a4* был выше, чем у a/a мышей ($p < 0.05$, post-hoc Fisher's LSD test), затем снизился и в возрасте 30 нед был почти в три раза ниже, чем в возрасте 10 нед ($p < 0.01$, post-hoc Fisher's LSD test) (рис. 4, a).

Уровень мРНК *Cpt1b* изменялся с возрастом (ANOVA, влияние возраста $F_{2,31} = 23.9$; $p < 0.001$). Возрастная динамика существенно различалась у A^y/a и a/a мышей (ANOVA, взаимодействие факторов «генотип» и «возраст» $F_{2,31} = 4.1$; $p < 0.05$). У a/a мышей уровень мРНК *Cpt1b* повышался к 15 нед в 2.5 раза, у A^y/a мышей такого повышения не наблюдалось. Уровень мРНК *CPT1* у A^y/a мышей был ниже, чем у a/a мышей (ANOVA, влияние генотипа $F_{1,31} = 11.8$; $p < 0.01$), особенно ярко это проявлялось в 10 нед, когда он был ниже в 2.2 раза ($p < 0.05$, t -критерий Стьюдента), и в 15 нед – в 2.5 раза ($p < 0.001$, post-hoc Fisher's LSD test) ниже, чем у a/a мышей (рис. 4, b).

Уровень мРНК *Ucp3* также изменялся с возрастом (ANOVA, влияние возраста $F_{2,33} = 5.6$; $p < 0.01$), и возрастная динамика существенно различалась у A^y/a и a/a мышей (ANOVA, взаимодействие факторов «генотип» и «возраст» $F_{2,33} = 5.6$; $p < 0.01$). У a/a

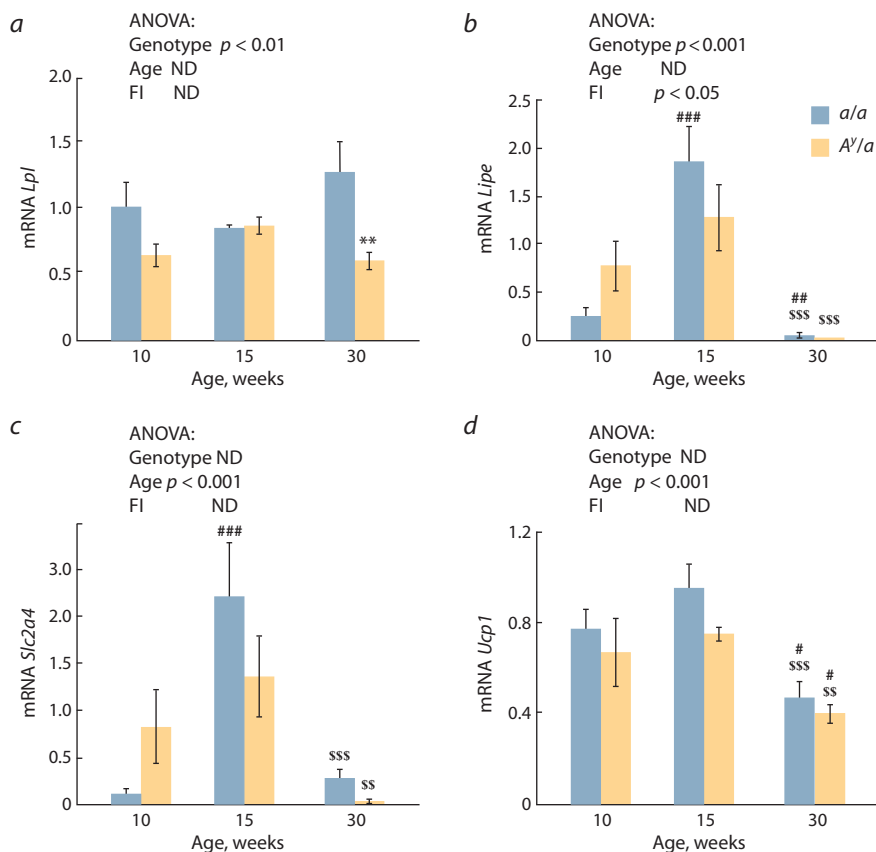


Fig. 3. Levels of (a) *Lpl*, (b) *Lipe*, and (c) *Slc2a4* mRNAs in white fat and (d) *Ucp1* in brown fat in 10, 15, and 30-week old a/a and A^y/a mice.

Designations follow Fig. 1.

мышей уровень мРНК *Ucp3* повысился к возрасту 15 нед в 2.3 раза ($p < 0.001$ post-hoc Fisher's LSD test), а затем снизился к возрасту 30 нед в 2.4 раза ($p < 0.001$, post-hoc Fisher's LSD test), у A^y/a мышей не наблюдалось подобных изменений. Уровень мРНК *Ucp3* у A^y/a мышей был ниже, чем у a/a мышей (ANOVA, влияние генотипа $F_{1,33} = 9.1$; $p < 0.01$), особенно ярко это проявлялось в возрасте 15 нед, когда он у A^y/a мышей был в 2.5 раза ниже, чем у a/a мышей ($p < 0.001$, post-hoc Fisher's LSD test) (см. рис. 4, $в$).

Таким образом, A^y/a и a/a мыши демонстрировали различную динамику возрастных изменений уровня мРНК *Cpt1b* и *Ucp3* в скелетной мускулатуре и существенные различия по абсолютным значениям в возрасте 15 нед.

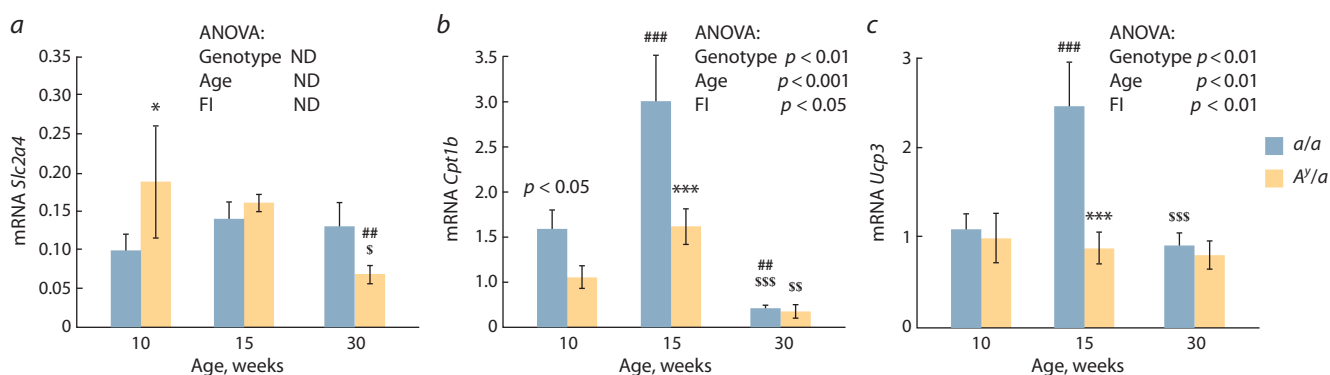


Fig. 4. Levels of (a) *Slc2a4*, (b) *Cpt1b*, and (c) *Ucp3* mRNAs in the skeletal muscle tissue of 10, 15, and 30-week old a/a and A^y/a mice.

Designations follow Fig. 1.

Обсуждение

В настоящей работе мы впервые показали динамику экспрессии генов белков, регулирующих процессы липолиза, липогенеза и захвата глюкозы в белом жире, окисления СЖК и захвата глюкозы в мышцах, а также термогенеза в буром жире по мере развития ожирения у мышей, predisposed к монолокусному МК ожирению.

Влияние мутации *A^y* на экспрессию генов, вовлеченных в углеводно-жировой обмен, у мышей в возрасте 10 нед
Интенсивность экспрессии генов, вовлеченных в углеводно-жировой обмен, в мышцах и жире определяется факторами, как средовыми, в частности развитием ожирения (Kim et al., 2006), так и генетическими. В возрасте 10 нед метаболический фенотип *A^{y/a}* мышей не отличался от такового у *a/a* мышей. Они имели одинаковые массу тела, доли белого и бурого жира, уровни биохимических показателей в крови, а также уровни мРНК всех исследованных генов в белом и буром жире. Однако в скелетной мускулатуре у *A^{y/a}* мышей уже в возрасте 10 нед уровень мРНК *Cpt1b* (молекулярный маркер окисления СЖК) был в два раза ниже, чем у *a/a* мышей. Эти данные предполагают, что скелетная мускулатура является наиболее вероятным звеном непосредственного влияния периферической МК системы на углеводно-жировой обмен. Известно, что на клетках скелетной мускулатуры экспрессируются МК рецепторы 1-го и 5-го типов (Gantz, Fong, 2003; An et al., 2007), активация которых *in vitro* усиливает окисление СЖК, что ассоциируется с активацией фермента CPT1 и молекулярного каскада AMP-activated protein kinase (AMPK) (An et al., 2007), который через стимуляцию экспрессии peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) активирует промотор гена *Cpt1b* (Liu et al., 2007). Мы предполагаем, что у *A^{y/a}* мышей блокада МК рецептора 5-го типа, вызванная повсеместной экспрессией гена белка Агути, приводит к снижению экспрессии гена *Cpt1b* в скелетной мускулатуре. Этот эффект в большей или меньшей степени проявляется во всех возрастных группах.

Кроме того, в возрасте 10 нед у *A^{y/a}* мышей в мышцах пониженная (относительно *a/a* мышей) экспрессия *Cpt1b* сочеталась с повышенной (относительно *a/a* мышей) экспрессией *Slc2a4*. Это согласуется с данными других авторов (Shi et al., 2013), которые показали, что у мышей C57Bl/6J с недостаточностью по гену *Cpt1b* повышен уровень мРНК *Slc2a4* в скелетной мускулатуре. Разнонаправленные изменения в экспрессии *Slc2a4* и *Cpt1b* в мышцах у 10-недельных *A^{y/a}* мышей относительно контроля еще раз подтверждают существование конкурентных взаимоотношений между использованием в качестве источников энергии жиров (молекулярный маркер – мРНК *Cpt1b*) и углеводов (молекулярный маркер – мРНК *Slc2a4*) (Physiology, 2004).

Влияние мутации *A^y* на динамику изменения экспрессии генов, вовлеченных в углеводно-жировой обмен, у мышей 10–15-й нед жизни

У мышей линии C57Bl/6J в период наиболее интенсивного постпубертатного роста (10–15 нед) (Tare et al., 2002) не обнаружено генотипических различий по массе тела,

доле жира, концентрации ТГ, СЖК и глюкозы в крови. У мышей обоих генотипов к возрасту 15 нед повысилась масса тела и не изменялись другие показатели углеводно-жирового обмена, включая долю белого и бурого жира. По-видимому, увеличение массы тела в этот период в основном было обусловлено линейным ростом мышечной и костной ткани, и мутация *A^y* не влияла на этот процесс. Однако в этот период мутация *A^y* затрагивала динамику изменений транскрипции генов, белки которых участвуют в регуляции углеводно-жирового обмена, в белой жировой ткани и мышцах. У *a/a* мышей 15-недельного возраста по сравнению с 10-недельными мышами были многократно повышены уровни мРНК генов белков, регулирующих процессы липолиза (*Lipe*) и захвата глюкозы (*Slc2a4*) в белом жире, а также окисления СЖК (*Cpt1b*) и защиту от окислительного стресса (*Ucp3*) в мышцах. Это повышение экспрессии генов могло быть связано с активацией в возрасте 15 нед андрогенной функции семенника. Показано, что у самцов мышей C57Bl/6J концентрация андрогенов в плазме и их продукция в семенниках возрастают с 10-й до 15-й нед жизни в 8–10 раз (Осадчук и др., 2016). Андрогены способны активировать гормональную ось – гормон роста (ГР)/инсулиноподобный фактор роста-1 (ИФР-1) (Cummings, Merriam, 1999). Совместно гормоны этой оси и андрогены усиливают как анаболические процессы (Yakar et al., 2016), так и окисление энергетических субстратов в организме (Richelsen et al., 2000; Kelly, Jones, 2013; Varlamov et al., 2014).

Мутация *A^y* устраняла повышение экспрессии всех вышеперечисленных генов в возрасте 15 нед. Можно предположить, что одной из причин этого является изменение активности системы ГР/ИФР-1. Показано (Wolff et al., 1999b), что у мышей с мутацией *viable yellow* (*A^y*), которые также характеризуются повсеместной экспрессией блокатора МК рецепторов – белка Агути (Claycombe et al., 2000), снижен относительно мышей дикого типа, диапазон возрастных колебаний ГР в период интенсивного роста. В другой модели генетического снижения активности МК рецепторов – мышей, нокаутных по МК рецептору 4-го типа, – в возрасте 15–17 нед снижен уровень ГР в крови по сравнению с мышами дикого типа (Shaw et al., 2005). Следовательно, мутации, снижающие активность МК рецепторов, в молодом и раннем взрослом возрасте подавляют активность системы ГР/ИФР-1, которая является одним из пусковых механизмов активации генов в белом жире и мышцах в ходе онтогенеза.

Полученные результаты позволяют предположить, что в возрасте 15 нед в мышцах у *A^{y/a}* мышей по сравнению с контрольными мышами того же возраста понижено окисление СЖК (мРНК *Cpt1b*) и повышено образование продуктов перекисного окисления липидов, несущих реактивные формы кислорода (мРНК *Ucp3*), а в белом жире уменьшена интенсивность липолиза (мРНК *Lipe*). Эти процессы должны приводить к накоплению СЖК, способствовать депонированию ТГ в клетках жира. Кроме того, у 15-недельных *A^{y/a}* мышей был снижен относительно *a/a* мышей уровень мРНК *Slc2a4*. Это, наряду со пониженным уровнем мРНК *Ucp3*, может способствовать формированию у *A^{y/a}* мышей инсулинорезистентности (Fridlyand, Philipson, 2006) еще до манифестации МК ожирения.

Влияние мутации A^y на динамику изменения экспрессии генов, вовлеченных в углеводно-жировой обмен, у мышей с 15-й по 30-ю нед жизни

В период с 15-й по 30-ю нед жизни у мышей обоих генотипов наряду с увеличением массы тела увеличивалась также доля белого и бурого жира и повышался уровень ТГ в крови, т.е. появлялись признаки развития ожирения. У мышей обоих генотипов повышение доли жировой ткани ассоциировалось со значительным снижением экспрессии *Lipe*, *Slc2a4* в белом жире, *Cpt1b* в мышцах и *Ucp1* (термогенез) в буром жире. Это снижение транскрипционной активности нельзя объяснить снижением уровня андрогенов в крови у 30-недельных мышей по сравнению с 15-недельными, поскольку показано, что у 30-недельных a/a и A^y/a мышей концентрация тестостерона не отличалась от таковой у 15-недельных мышей (Осадчук и др., 2016). Причины возрастного снижения экспрессии генов, которое было обнаружено у мышей как дикого типа, так и склонных к развитию генетического ожирения, требуют дальнейшего изучения. Интересно отметить, что усиление к возрасту 15 нед (описанное у a/a мышей) и последующее снижение к возрасту 30 нед (у a/a и A^y/a мышей) экспрессии изученных в работе генов полностью совпадают с возрастной динамикой добровольной двигательной активности у C57Bl/6J мышей (Figueiredo et al., 2009). Согласно данным, у мышей в возрасте 14–15 нед наблюдается пик двигательной активности с последующим снижением к возрасту 25–30 нед. Положительная корреляция между физической активностью и экспрессией *Cpt1b* и *Ucp3* в мышцах, *Ucp1* в буром жире, а также интенсивностью липолиза в белом жире показана рядом исследователей. Физическая нагрузка повышает экспрессию гена и белка CPT1 и UCP3 (Niu et al., 2010; Shen et al., 2015) в мышцах, *Ucp1* – в буром жире (Slocum et al., 2013), а также усиливает активность липолиза в белом жире (Niu et al., 2010; Shen et al., 2015).

Очевидно, что снижение к возрасту 30 нед экспрессии генов в мышцах (*Ucp3*, *Cpt1b*), белом жире (*Lipe*, *Slc2a4*) и буром жире (*Ucp1*) инициировало развитие возрастного «физиологического» ожирения даже у a/a мышей. Однако, несмотря на то что у 30-недельных A^y/a мышей уровни мРНК вышеперечисленных генов не отличались от таковых у 30-недельных a/a мышей, признаки ожирения у A^y/a мышей были выражены значительно сильнее. Это может быть связано с тем, что на предыдущих этапах развития A^y/a мышей был изменен профиль экспрессии генов жирового обмена в мышцах: у них снижена относительно a/a мышей транскрипция *Cpt1b* (в 10 и 15 нед) и транскрипция *Ucp3* (в 15 нед). Кроме того, в возрасте 30 нед у A^y/a мышей снижена относительно a/a мышей транскрипция *Lpl* в белом жире. Эти результаты согласуются с данными других авторов (Chiu et al., 2004), которые показали, что у мышей с мутацией A^y при развитом ожирении повышены уровни в крови липопротеинов высокой и низкой плотности, а также снижен уровень мРНК *Lpl* в белом жире в два раза по сравнению с контрольными мышами. Это предположило, что сниженный уровень мРНК *Lpl* у 30-недельных A^y/a мышей способствовал снижению гидролиза ТГ и повышению их уровня в крови (Goldberg, Merkel, 2001; Kersten, 2014).

Таким образом, мы впервые показали, что развитие ожирения у A^y/a мышей может быть связано не только с повышенным потреблением пищи, но и со снижением экспрессии генов белков ключевых ферментов углеводно-жирового обмена в мышцах и белом жире, которое проявлялось задолго до манифестации ожирения. Уже в возрасте 10 нед в скелетных мышцах у A^y/a мышей была снижена (относительно мышей дикого типа) экспрессия *Cpt1b*, контролирующего окисление СЖК. В возрасте 15 нед мутация A^y устраняла возрастную активацию экспрессии генов белков, регулирующих окисление СЖК в мышцах (*Cpt1b*, *Ucp3*), гидролиз ТГ (*Lipe*) и захват глюкозы (*Slc2a4*) в белом жире и тем самым способствовала отложению жира. Мутация A^y не влияла на снижение экспрессии генов, вовлеченных в регуляцию липолиза, захвата глюкозы в белом жире, окисление СЖК в мышцах и термогенез в буром жире, которые обнаружены у мышей дикого типа в возрасте 30 нед и ассоциировались с формированием у них возрастного «физиологического» ожирения.

Окончательный вывод, о том, какой вклад в развитие МК ожирения вносит изменение профиля экспрессии генов в мышцах, белом и буром жире, можно будет сделать после изучения экспрессии соответствующих белков в тех же возрастных группах мышей.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Science Foundation, project 17-15-01036.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- An J.J., Rhee Y., Kim S.H., Kim D.M., Han D.H., Hwang J.H., Jin Y.J., Cha B.S., Baik J.H., Lee W.T., Lim S.K. Peripheral effect of α -melanocyte-stimulating hormone on fatty acid oxidation in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 2007;282(5):2862-2870. DOI 10.1074/jbc.M603454200.
- Bahzan N.M., Yakovleva T.V., Baginskaya N.V., Shevchenko A.Yu., Makarova E.N. Changes of lipid-carbohydrate metabolism during the development of melanocortin obesity in mice with the Agouti Yellow mutation. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova* = *I.M. Sechenov Physiological Journal*. 2005;91(12):1445-1453. (in Russian)
- Bonnefont J.P., Djouadi F., Prip-Buus C., Gobin S., Munnich A., Bastin J. Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. *Mol. Asp. Med.* 2004;25(5):495-520. DOI 10.1016/j.mam.2004.06.004.
- Brito M.N., Brito N.A., Baro D.J., Song C.K., Bartness T.J. Differential activation of the sympathetic innervation of adipose tissues by melanocortin receptor stimulation. *Endocrinology*. 2007;148(11):5339-5347. DOI 10.1210/en.2007-0621.
- Cannon B., Nedergaard J.A.N. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* 2004;84(1):277-359. DOI 10.1152/physrev.00015.2003.
- Carmen G.-Y., Victor S.-M. Signalling mechanisms regulating lipolysis. *Cell. Sign.* 2006;18:401-408. DOI 10.1016/j.cellsig.2005.08.009.
- Carroll L., Voisey J., Van Daal A. Mouse models of obesity. *Clin. Dermatol.* 2004;22(4):345-349. DOI 10.1016/j.clindermatol.2004.01.004.
- Chiu S., Fisler J.S., Espinal G.M., Havel P.J., Stern J.S., Warden C.H. The yellow agouti mutation alters some but not all responses to diet and exercise. *Obes. Res.* 2004;12(8):1243-1255.

- Claycombe K.J., Xue B.Z., Mynatt R.L., Zemel M.B., Moustaid-Moussa N. Regulation of leptin by agouti. *Physiol. Genomics*. 2000;2(3): 101-105.
- Cummings D.E., Merriam G.R. Age-related changes in growth hormone secretion: Should the somatopause be treated? *Semin. Reprod. Endocr.* 1999;17(4):311-325. DOI 10.1055/s-2007-1016241.
- Figueiredo P.A., Powers S.K., Ferreira R.M., Amado F., Appell H.J., Duarte J.A. Impact of lifelong sedentary behavior on mitochondrial function of mice skeletal muscle. *J. Geront. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2009;64(9):927-939. DOI 10.1093/gerona/glp066.
- Fridlyand L.E., Philipson L.H. Reactive species and early manifestation of insulin resistance in type 2 diabetes. *Diabetes Obes. Metab.* 2006; 8(2):136-145. DOI 10.1111/j.1463-1326.2005.00496.x.
- Gantz I., Fong T.M. The melanocortin system. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2003;284(3):468-474. DOI 10.1152/ajpendo.00434.2002.
- Goldberg I.J., Merkel M. Lipoprotein lipase: physiology, biochemistry, and molecular biology. *Front. Biosci.* 2001;6(6):D388-D405.
- Gong L., Yao F., Hockman K., Heng H.H., Morton G.J., Takeda K., Akira S., Low M.J., Rubinstein M., MacKenzie R.G. Signal transducer and activator of transcription-3 is required in hypothalamic agouti-related protein/neuropeptide Y neurons for normal energy homeostasis. *Endocrinology*. 2008;149(7):3346-3354. DOI 10.1210/en.2007-0945.
- Im S.S., Kwon S.K., Kim T.H., Kim H.I., Ahn Y.H. Regulation of glucose transporter type 4 isoform gene expression in muscle and adipocytes. *IUBMB Life*. 2007;59(3):134-145. DOI 10.1080/15216540701313788.
- Karpe F., Dickmann J.R., Frayn K.N. Fatty acids, obesity, and insulin resistance: time for a reevaluation. *Diabetes*. 2011;60(10):2441-2449. DOI 10.2337/db11-0425.
- Kelly D.M., Jones T.H. Testosterone: A metabolic hormone in health and disease. *J. Endocrin.* 2013;217(3):R25-R45. DOI 10.1530/JOE-12-0455.
- Kersten S. Physiological regulation of lipoprotein lipase. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molec. Cell. Biol. Lipids*. 2014;1841(7):919-933. DOI 10.1016/j.bbalip.2014.03.013.
- Kim J.Y., Tillison K., Lee J.-H., Rearick D.A., Smas C.M. The adipose tissue triglyceride lipase ATGL/PNPLA2 is downregulated by insulin and TNF- α in 3T3-L1 adipocytes and is a target for transactivation by PPAR γ . *Am. J. Physiol. Endocr. Metab.* 2006;291:E115-E127. DOI 10.1152/ajpendo.00317.2005.
- Kim T., He L., Johnson M.S., Li Y., Zeng L., Ding Y., Long Q., Moore J.F., Sharer J.D., Nagy T.R., Young M.E., Wood P.A., Yang Q. Carnitine palmitoyltransferase 1b deficiency protects mice from diet-induced insulin resistance. *J. Diabetes Metab.* 2014;5(4):361. DOI 10.4172/2155-6156.1000361.
- Lass A., Zimmermann R., Oberer M., Zechner R. Lipolysis – a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Prog. Lipid. Res.* 2011;50:14-27. DOI 10.1016/j.plipres.2010.10.004.
- Lee M.S., Kim I.H., Kim Y. Effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on uncoupling protein 3 gene expression in C₂C₁₂ muscle cells. *Nutrients*. 2013;5(5):1660-1671. DOI 10.3390/nu5051660.
- Lee Y.S. The role of leptin-melanocortin system and human weight regulation: lessons from experiments of nature. *Ann. Acad. Med. Singapore*. 2009;38(1):34-44.
- Liu H.Y., Zheng G., Zhu H., Woldegiorgis G. Hormonal and nutritional regulation of muscle carnitine palmitoyltransferase I gene expression in vivo. *Arch. Biochem. Biophys.* 2007;465(2):437-442. DOI 10.1016/j.abb.2007.06.026.
- Makarova E.N. Agouti proteins, new regulators of melanocortin receptors. *Uspekhi sovremennoy biologii = Advances in Current Biology*. 2002;122(4):365-375. (in Russian)
- Michaud E.J., Bultman S.J., Klebig M.L., Van Vugt M.J., Stubbs L., Russell L.B., Woychik R.P. A molecular model for the genetic and phenotypic characteristics of the mouse lethal yellow (*Ay*) mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Genetics*. 1994;91(7):2562-2566.
- Murea M., Ma L., Freedman B.I. Genetic and environmental factors associated with type 2 diabetes and diabetic vascular complications. *Rev. Diabet. Stud.* 2012;9(1):6-22. DOI 10.1900/RDS.2012.9.6.
- Nakamura Y., Sato T., Shiimura Y., Miura Y., Kojima M. FABP3 and brown adipocyte-characteristic mitochondrial fatty acid oxidation enzymes are induced in beige cells in a different pathway from UCP1. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 2013;441(1):42-46. DOI 10.1016/j.bbrc.2013.10.014.
- Niu Y., Yuan H., Fu L. Aerobic exercise's reversal of insulin resistance by activating AMPK α -ACC-CPT1 signaling in the skeletal muscle of C57BL/6 mice. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 2010;20(5): 370-380.
- Osadchuk L.V., Kleshchev M.A., Baklanov A.V., Bazhan N.M. Testicular function and lipid metabolism in male mice with hereditary predisposition to obesity. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova = I.M. Sechenov Physiological Journal*. 2016; 102(3):340-350. (in Russian)
- Physiology. Eds. R.M. Berne, M.N. Levy, B.M. Koeppen, B.A. Stanton. St. Louis: Mosby, 2004;1014.
- Richelsen B., Pedersen S.B., Kristensen K., Børglum J.D., Nørrelund H., Christiansen J.S., Jørgensen J.O. Regulation of lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase activity and gene expression in adipose and muscle tissue by growth hormone treatment during weight loss in obese patients. *Metab. Clin. Exp.* 2000;49(7):906-911. DOI 10.1053/meta.2000.6738.
- Shaw A.M., Irani B.G., Moore M.C., Haskell-Luevano C., Millard W.J. Ghrelin-induced food intake and growth hormone secretion are altered in melanocortin 3 and 4 receptor knockout mice. *Peptides*. 2005;26(10):1720-1727.
- Shen Y., Xu X., Yue K., Xu G. Effect of different exercise protocols on metabolic profiles and fatty acid metabolism in skeletal muscle in high-fat diet-fed rats. *Obesity*. 2015;23(5):1000-1006. DOI 10.1002/oby.21056.
- Shi W., Hu S., Wang W., Zhou X., Qiu W. Skeletal muscle-specific CPT1 deficiency elevates lipotoxic intermediates but preserves insulin sensitivity. *J. Diabetes. Res.* 2013;2013:163062. DOI 10.1155/2013/163062.
- Silva A.A., Carmo J.M., Wang Z., Hall E.J. The brain melanocortin system, sympathetic control, and obesity hypertension. *Physiology*. 2014;29(3):196-202. DOI 10.1152/physiol.00061.2013.
- Slocum N., Durrant J.R., Bailey D., Yoon L., Jordan H., Barton J., Brown R., Clifton H., Milliken L., Harrington T., Kimbrough W., Faber C., Cariello C.A., Elangb. N. Responses of brown adipose tissue to diet-induced obesity, exercise, dietary restriction and ephedrine treatment. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2013;65(5):549-557. DOI 10.1016/j.etp.2012.04.001.
- Talbot D.A., Lambert A.J., Brand M.D. Production of endogenous matrix superoxide from mitochondrial complex I leads to activation of uncoupling protein 3. *FEBS Lett.* 2004;556(1):111-115.
- Tare R.S., Oreffo R.O., Sato K., Rauvala H., Clarke N.M., Roach H.I. Effects of targeted overexpression of pleiotrophin in postnatal bone development. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 2002;298(3):324-332.
- Varlamov O., Bethea C.L., Roberts C.T. Sex-specific differences in lipid and glucose metabolism. *Front. Endocrinol.* 2014;5:241. DOI 10.3389/fendo.2014.00241.
- Waalén J. The genetics of human obesity. *Transl. Res.* 2014;164(4):293-301. DOI 10.1038/nrg1556.
- Wolff G.L., Kodell R.L., Kaput J.A., Visek W.J. Caloric restriction abolishes enhanced metabolic efficiency induced by ectopic agouti protein in yellow mice. *Exp. Biol. Med.* 1999a;221(2):99-104.
- Wolff G.L., Roberts D.W., Mountjoy K.G. Physiological consequences of ectopic agouti gene expression: the yellow obese mouse syndrome. *Physiol. Genomics*. 1999b;1(3):151-163.
- Yakar S., Isaksson O. Regulation of skeletal growth and mineral acquisition by the GH/IGF-I axis. Lessons from mouse models. *Growth Horm. IGF Res.* 2016;28:26-42. DOI 10.1016/j.ghir.2015.09.004.
- Yang J.Y., Koo J.H., Yoon H.Y., Lee J.H., Park B.H., Kim J.S., Chi M.S., Park J.W. Effect of scopoletin on lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes. *Int. J. Mol. Med.* 2007;20(4):527-531.
- Ying H.Z., Zang J.N., Deng L.L., Wang Z.Y., Yu C.H. Pentamethylquercetin reduces fat deposition via Sirt1-mediated pathways in male obese mice induced by a high-fat diet. *Food Chem. Toxicol.* 2013;62:463-469. DOI 10.1016/j.fct.2013.09.002.



Гомологи гена *rolC* природно-трансгенных льнянок *Linaria vulgaris* и *Linaria cretica* экспрессируются *in vitro*

Т.В. Матвеева¹✉, О.Д. Богомаз¹, Л.А. Голованова¹, Ю.С. Ли², Д. Димитров³

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

² Всероссийский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Россия

³ Национальный музей естественной истории, София, Болгария

Агробактериальная трансформация – самый распространенный способ получения трансгенных растений в лабораторных условиях. В природе в пределах родов *Nicotiana*, *Linaria* и *Ipomoea* описаны виды, содержащие в геномах гомологи генов Т-ДНК агробактерий, как результат агробактериальной трансформации их предковых форм. Такие растения называют природно-трансгенными, а Т-ДНК в них обозначается как клеточная (кЛТ-ДНК). Предполагается, что в эволюции указанных родов привнесенные последовательности играли важную роль. Эту мысль подтверждают данные о неоднократной трансформации нескольких видов растений в ходе эволюции и сведения об экспрессии некоторых генов кЛТ-ДНК у *Nicotiana* и *Ipomoea*. Ранее экспрессия генов кЛТ-ДНК у *Linaria* не была описана, хотя анализ нуклеотидной последовательности гена *rolC* (наиболее консервативного из генов Т-ДНК) свидетельствует в пользу его функциональности у *L. vulgaris* Mill., *L. acutiloba* Fisch. ex Rchb. и *L. genistifolia* (L.) Mill. В настоящей работе проведено секвенирование гомолога гена *rolC* у прежде не изученного вида льнянки *Linaria cretica* Kuprian. Анализ *in silico* показал, что этот ген кодирует полноразмерный пептид. С использованием метода ОТ-ПЦР в реальном времени мы продемонстрировали, что *rolC* экспрессируется в культуре растений *in vitro* в побегах, корнях и каллусах *L. vulgaris* Mill., а также в побегах *L. cretica* Kuprian. Полученные результаты – важный факт в пользу того, что кЛТ-ДНК функциональна и ее закрепление в геномах играло определенную роль в ходе эволюции. Однако уровень экспрессии изучаемого гена достаточно низок у льнянок. Кроме того, аналогичная тенденция отмечена и у других природно-трансгенных видов. Этим можно объяснить отсутствие явных морфологических отличий видов, содержащих кЛТ-ДНК, от их не-трансгенных родственников.

Ключевые слова: *Linaria*; кЛТ-ДНК; *rolC*; экспрессия трансгена; культура *in vitro*.

Homologs of the *rolC* gene of naturally transgenic toadflaxes *Linaria vulgaris* and *Linaria cretica* are expressed *in vitro*

T.V. Matveeva¹✉, O.D. Bogomaz¹, L.A. Golovanova¹, Yu.S. Li², D. Dimitrov³

¹ Saint-Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

² All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia

³ National Museum of Natural History, Sofia, Bulgaria

Agrobacterium mediated transformation is the most common way for obtaining transgenic plants in laboratory conditions. At the same time, there are species inside the genera *Nicotiana*, *Linaria* and *Ipomoea* that contain homologs of agrobacterial T-DNA genes as a result of genetic transformation of their ancestral forms in natural conditions. Such plants are called naturally transgenic plants, and T-DNA in their genomes is called cellular (cT-DNA). It is proposed that in the evolution of these genera, the introduced sequences played an important role. This idea is confirmed by the data on the expression of some T-DNA genes in *Nicotiana* and *Ipomoea*. Until the last moment, the expression of cT-DNA genes in *Linaria* has not been documented. However, the analysis of the nucleotide sequence indicates the functionality of *rolC* gene in *L. vulgaris* Mill., *L. acutiloba* Fisch. ex Rchb., *L. genistifolia* (L.) Mill. In this research work, we have sequenced the *rolC* homolog in one more toadflax species (*Linaria cretica* Kuprian). The *in silico* analysis of this gene has shown that it can encode a full-length peptide. Using the real time RT-PCR method, we have demonstrated that the *rolC* homolog is expressed *in vitro* in shoots, roots and calli of *L. vulgaris* Mill., as well as in shoots of *L. cretica* Kuprian. The results obtained are an important argument in favor of the fact that cT-DNA is functional and that its fixation in genomes played a certain role in the evolutionary process. However, the level of expression of the gene studied is quite low. A similar trend was observed in other naturally transgenic species. This can explain the absence of explicit morphological differences of species containing cT-DNA from their non-transgenic relatives.

Key words: *Linaria*; cT-DNA; *rolC*; transgene expression; *in vitro*.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Матвеева Т.В., Богомаз О.Д., Голованова Л.А., Ли Ю.С., Димитров Д. Гомологи гена *rolC* природно-трансгенных льнянок *Linaria vulgaris* и *Linaria cretica* экспрессируются *in vitro*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(2):273-278. DOI 10.18699/VJ18.359

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Matveeva T.V., Bogomaz O.D., Golovanova L.A., Li Yu.S., Dimitrov D. Homologs of the *rolC* gene of naturally transgenic toadflaxes *Linaria vulgaris* and *Linaria cretica* are expressed *in vitro*. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(2):273-278. DOI 10.18699/VJ18.359 (in Russian)

Агробактериальная трансформация является самым распространенным способом получения трансгенных растений в лабораторных условиях (Vain, 2007; www.isaaa.org). Вместе с тем в природе описаны виды, содержащие в геномах гомологи генов Т-ДНК агробактерий. Эти виды относятся к родам *Nicotiana*, *Ipomoea* и *Linaria* (White et al., 1983; Furner et al., 1986; Matveeva et al., 2012; Chen et al., 2014; Kyndt et al., 2015). Предковые формы таких растений были трансформированы в природных условиях и не только смогли выжить после этого, но и дали начало новым видам, стабильно передающим Т-ДНК своим потомкам. В геномах природно-трансгенных растений Т-ДНК получила название клеточной (клТ-ДНК) (White et al., 1983). У табака последовательности клТ-ДНК охарактеризованы наиболее детально: обнаружено, что у представителей разных видов клеточные Т-ДНК различаются по составу и количеству интегрированных в геном фрагментов, кроме того, показано, что гены клТ-ДНК экспрессируются (Meyer et al., 1995; Nagata et al., 1996; Intrieri, Buiatti, 2001; Chen, Otten, 2017). Экспрессия всех генов клТ-ДНК отмечена также у батата (Kyndt et al., 2015). Только у льнянок экспрессия генов клТ-ДНК до сих пор не выявлена. Однако результаты сравнения нуклеотидных последовательностей клТ-ДНК у *L. vulgaris* Mill., *L. acutiloba* Fisch. ex Rechb. и *L. genistifolia* (L.) Mill. свидетельствуют о том, что наиболее консервативным геном с ненарушенной ОРС является *rolC* (Matveeva, Lutova, 2014). *L. vulgaris* и *L. acutiloba* относятся к секции *Linaria*, *L. genistifolia* – к секции *Speciosae*, *L. acutiloba* иногда рассматривают как подвид *L. vulgaris* (www.plantarium.ru). Поскольку все указанные виды содержат Т-ДНК, а сайт ее локализации в геноме у них совпадает, то был сделан вывод о монофилетическом происхождении секций, к которым относятся данные виды. Соответственно, предполагают, что и другие виды секций *Linaria* и *Speciosae* содержат клТ-ДНК (Matveeva, Lutova, 2014). В настоящей работе мы изучили экспрессию гена *rolC* у нескольких видов льнянок *in vitro*. В качестве объектов исследования были выбраны *L. vulgaris* и *L. genistifolia*; поскольку у них охарактеризована последовательность клТ-ДНК, они относятся к разным секциям, характеризуются наиболее широкими ареалами (www.plantarium.ru). Кроме того, мы использовали в работе вид, произрастающий на крайне бедных почвах меловых холмов Белгородской, Воронежской и Ростовской областей, – *L. cretica*. Выбор этих видов был не случаен. Мы исходили из того, что если привнесенные трансгены придавали растениям селективное преимущество, то это могло привести к широкому распространению природно-трансгенных форм или их адаптации к каким-либо экстремальным условиям. В качестве контрольного не содержащего клТ-ДНК вида использовали *L. maroccana* Hook (Matveeva et al., 2012). У данного вида не выявлено методами ПЦР и РВ-ПЦР ни одного из описанных у *L. vulgaris* генов клТ-ДНК.

До настоящего времени нет окончательной ясности относительно функций гена *rolC*. Предполагают его влияние на содержание цитокинина в клетке, углеводный обмен и вторичный метаболизм (Matveeva, Sokornova, 2017). Поскольку цитокинины контролируют программу побегообразования, в данном исследовании мы тести-

ровали способность к побегообразованию у эксплантов льнянок *in vitro* и оценивали экспрессию гена в побегах, а также эксплантах, склонных к побегообразованию.

Материалы и методы

Семена льнянок собирали в природных популяциях: *L. vulgaris* – в Ленинградской области (Старый Петергоф), *L. ceticola* – в Белгородской области вблизи пос. Чернянка, *L. genistifolia* – на Дунайской равнине у г. Лом. Семена *L. maroccana* сорта Калейдоскоп (ГК «Русский Огород-НК», Щелково, Московская область, Россия) приобретены в розничной торговле.

Семена обрабатывали в течение 5 мин 30 % раствором перекиси водорода и высевали на питательную среду Мурасиг–Скуга (МС) (Murashige, Skoog, 1962) без гормонов для прорастивания. Культивирование проводили при постоянном освещении. Растения поддерживали и размножали в асептической культуре черенкованием. Для изучения различных морфогенетических реакций экспланты междоузлий и корней помещали на среду МС без гормонов (МС0) и МС с добавлением гормонов БАП (бензиламинопурина) и/или НУК (нафтилуксусная кислота) в различных концентрациях. Учеты проводили через месяц после эксплантации. ДНК из растений выделяли ЦТАБ-методом (Дрейпер и др., 1991).

ПЦР на матрице геномной ДНК проводили в объеме 20 мкл, содержащем 1 мкл ДНК 10 мкл DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США), по 10 пмоль каждого праймера, под минеральным маслом в амплификаторе Терцик («ДНК-Технология», Москва, Россия) по программе: 5 мин – 95 °С, далее 35 циклов (95 °С – 15 с, 58 °С – 30 с, 72 °С – 30 с), финальная элонгация 5 мин при 72 °С. Последовательности всех использованных праймеров приведены в таблице. Праймеры синтезированы ЗАО «Евроген» (Москва, Россия). Электрофоретическое разделение фрагментов проводили в агарозном геле на 1-кратном буфере ТБЭ. Фрагменты визуализировали на трансиллюминаторе Vilber Lourmat при длине волны 254 нм.

Секвенирование фрагментов ДНК осуществляли при помощи набора BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США) по прилагаемому к нему протоколу. Разделение и анализ фрагментов сиквеновой смеси проводили на приборе AbiPrism 3500 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США).

РНК в каждом варианте опыта выделяли из смеси, содержащей материал не менее пяти эксплантов, при помощи набора лабораторных реагентов для выделения РНК из растений RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Дюссельдорф, Германия) по прилагаемому к нему протоколу.

Обратную транскрипцию ставили в объеме 20 мкл при помощи набора реагентов для синтеза первой цепи кДНК Maxima™ H Minus, (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США) по прилагаемому к нему протоколу.

ПЦР в реальном времени проводили в объеме 20 мкл, содержащем 1 мкл кДНК, 10 мкл смеси Luminaris™ Color HiGreen Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США) и по 10 пмоль праймеров по программе: 5 мин – 95 °С, далее 40 циклов (95 °С – 18 с, 55 °С – 30 с, 72 °С – 30 с) в амплификаторе АНК32 (ЗАО «Синтол», Москва,

Sequences of primers used in the study

Name	Sequence	Purpose
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Amplification of fragments for DNA-barcoding
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	
rolCF	CTGGATACAA GCCACATGTT	Amplification of the full-size gene
rolCR	ACTCGTCAGCCCATCGACTA	
Re-rolCF	GACGTGACATGCAGCGATGA	Analysis of expression
Re-rolCR	GAATGAGCAGATGGAGCTAAC	
gapdhF	ACTGGTGTCTTCACTGACAAGG	Reference gene coding for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase
gapdhR	TGACACCCACAACAAACATCGG	

Россия). Количество повторностей было не менее трех. Относительную экспрессию оценивали методом $\Delta\Delta C_t$ (Livak, Schmittgen, 2001). В качестве референсного гена использовали ген глицеральдегидфосфатдегидрогеназы *gapdh*.

В экспериментах по культивированию льнянок *in vitro* вычисляли процентное содержание эксплантов с различными типами морфогенетических реакций и его ошибку. Абсолютные частоты эксплантов с различными морфогенетическими реакциями сравнивали между собой с использованием критерия хи-квадрат (Терентьев, Ростова, 1977). Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей осуществляли с помощью программы MEGA 7.0.21 (Kumar et al., 2016).

Результаты и обсуждение

После проращивания семян для подтверждения видовой принадлежности растений *L. cretica*, *L. genistifolia* и *L. maroccana* проведено секвенирование фрагментов, содержащих их ITS1, ген 5.8S РНК, ITS2. Последовательности этого участка ДНК у *L. maroccana* и *L. genistifolia* идентичны последовательностям JX481097.1 и KT031859.1 (NCBI) соответственно. Последовательность анализируемого фрагмента *L. cretica* совпала на 99 % с сиквенсом JX481143.1 того же вида. Отличия были связаны с присутствием в референсном сиквенсе значительного количества неоднозначных прочтений нуклеотидов, поэтому мы депонировали полученную нами более точную последовательность в базу под номером KY611806.

Поскольку у *L. cretica* клТ-ДНК ранее не была охарактеризована, мы амплифицировали и секвенировали ген *rolC* из этого вида. В результате работы выявлено два варианта последовательности, которые депонированы в базу NCBI под номерами MF997051 и MF997052.

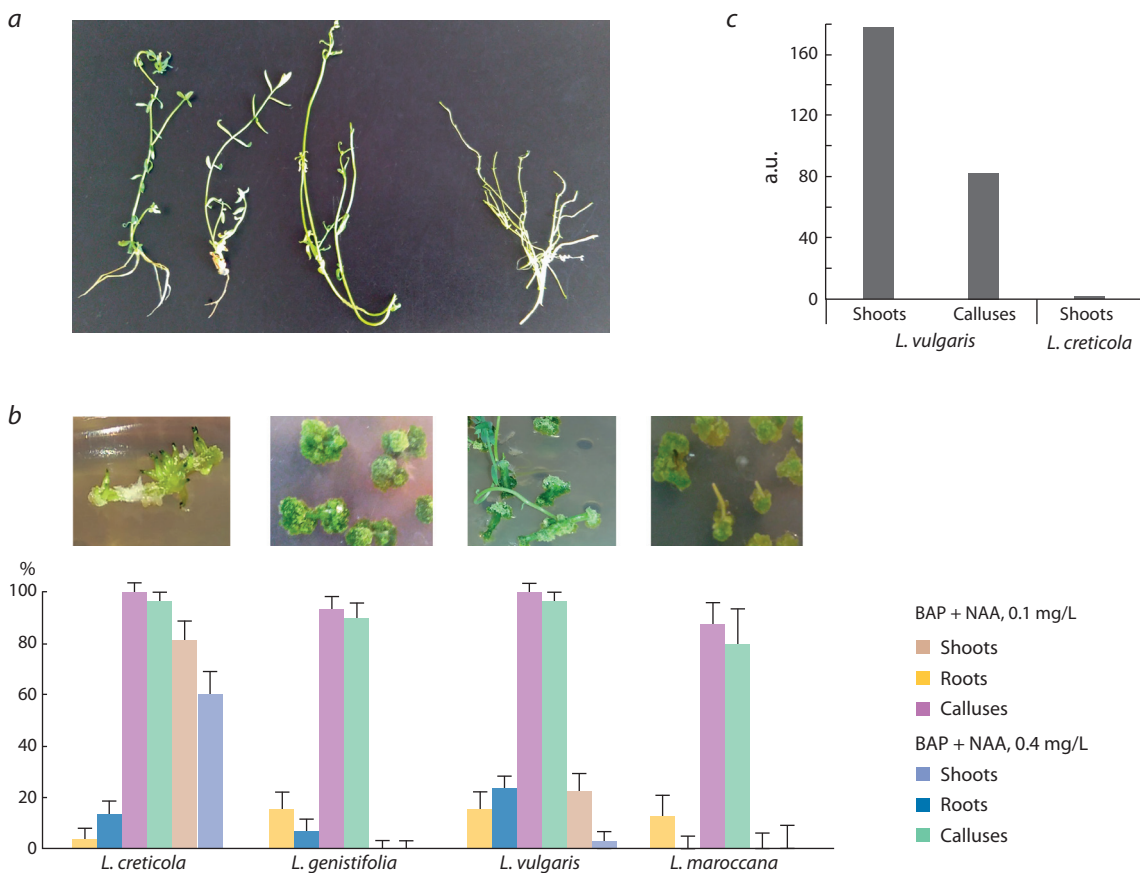
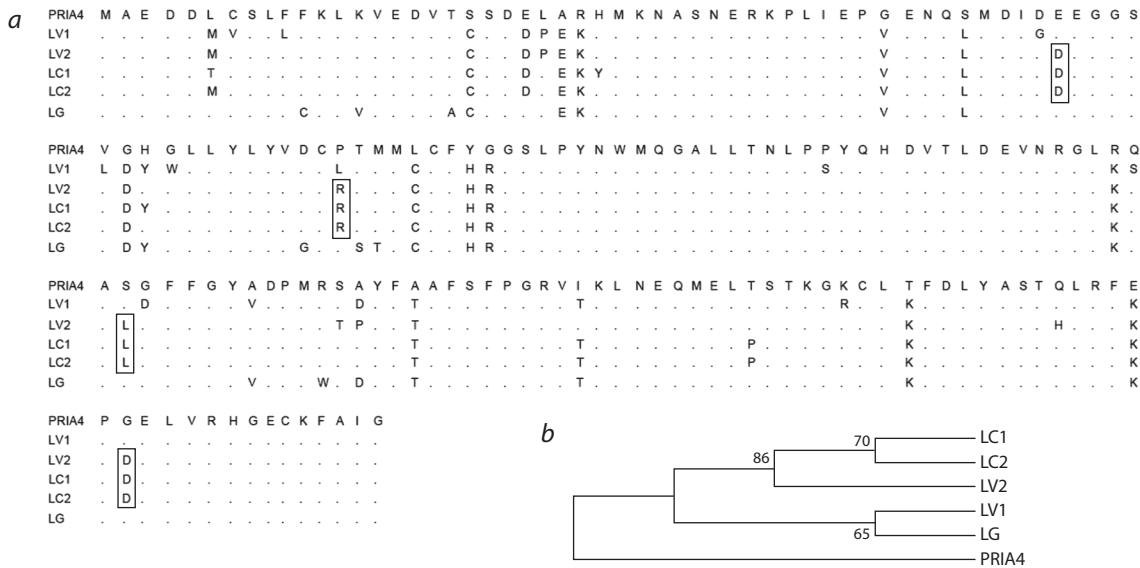
В результате сравнения сиквенсов показано, что оба гомолога могут кодировать полноразмерные пептиды, что подтверждает ранее высказанную идею о консервативности и возможной функциональности *rolC* у льнянок. Результаты сравнения полученных сиквенсов с известными последовательностями *rolC* льнянок свидетельствуют в пользу того, что установленные последовательности являются аллельными вариантами, более близкими к *rolC* правого плеча клТ-ДНК *L. vulgaris* (рис. 1).

В культуре *in vitro* при размножении черенкованием на среде МС0 побеги всех исследуемых видов легко увели-

чивали биомассу, достаточно быстро образовывали придаточные корни. Так, при помещении на среды фрагментов стеблей, содержащих по одному узлу, из пазушных почек развивались побеги, которые за месяц достигали высоты 5–7 см и начинали укореняться. Однако морфология побегов у разных видов различалась. *L. maroccana*, *L. vulgaris* и *L. genistifolia* формировали одиночные побеги нормального фенотипа, в то время как *L. cretica* образовывала огромное количество тонких сильно ветвящихся побегов с мелкими листьями (рис. 2, а).

Для оценки экспрессии гомологов *rolC* были использованы побеги льнянок. Поскольку уже показано (Matveeva, Sokornova, 2017), что экспрессия многих генов клТ-ДНК у табака наблюдается в каллусах, мы индуцировали каллусогенез из эксплантов междоузлий льнянок на средах с БАП и НУК. В первом варианте среды оба гормона использовали в концентрации 0.1 мг/л, а во втором – 0.4 мг/л. На обоих вариантах сред все исследованные виды льнянок образовывали каллусы с эффективностью, близкой к 100 %, но морфогенетические процессы у видов сильно различались (см. рис. 2, б). Каллусы *L. cretica* были покрыты многочисленными побегами. Экспланты *L. vulgaris* образовывали единичные побеги нормальной морфологии. Количество эксплантов с побегами у *L. cretica* было достоверно выше на обоих вариантах среды по сравнению с *L. vulgaris*. Отмечена тенденция более интенсивного побегообразования на среде с более низким содержанием гормонов. Каллусы *L. genistifolia* отличались от других тем, что были ярко-зеленого цвета. Регенерации побегов из каллусов *L. genistifolia* и *L. maroccana* не наблюдали. Эти данные иллюстрируют роль генотипа растения в регуляции регенерационных процессов (Лутова и др., 1994). Взаимосвязи между интенсивностью побегообразования и наличием в геноме Т-ДНК не выявлено. РНК выделили из каллусов, полученных на среде с содержанием 0.1 мг/л БАП и НУК.

Методом ОТ-ПЦР на матрице РНК, полученной из побегов и каллусов Т-ДНК-содержащих льнянок, выявлено, что ген экспрессируется в побегах *L. vulgaris* и *L. cretica*, а также в каллусах *L. vulgaris*. Относительная интенсивность экспрессии гена представлена на рис. 2, в. Во всех случаях интенсивность экспрессии была ниже, чем у референсного гена. Экспрессии гена у *L. genistifolia* в условиях данного эксперимента не выявлено. Таким образом, привнесенная в растения клТ-ДНК вписывается в систему



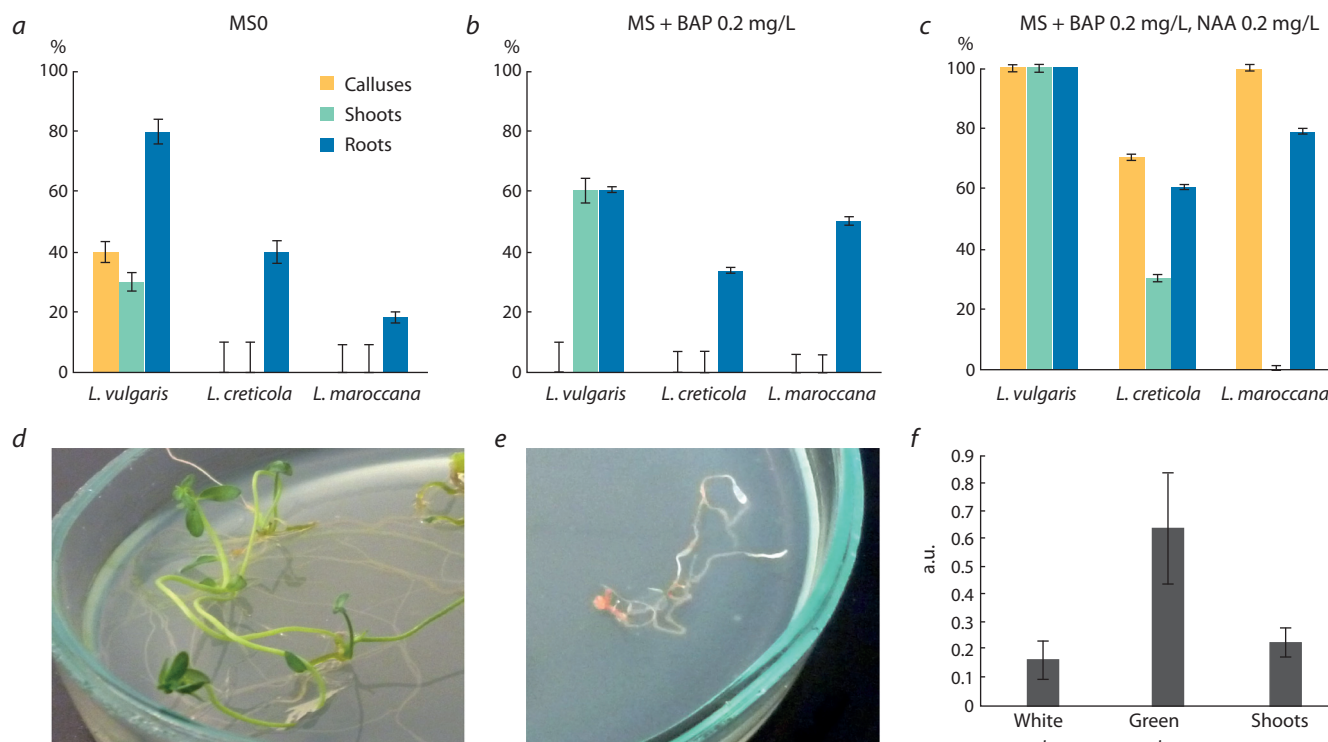


Fig. 3. The diversity of morphogenetic responses in growing explants of *Linaria* roots on various media.

(a-c) Quantitative parameters of repair processes in percentage terms. Medium compositions are shown in the panels. (d) A typical explant forming a shoot. (e) A typical explant forming only lateral roots on MS0 medium. (f) Relative *rolC* expression in *L. vulgaris* roots and shoots regenerating from them.

каждого генотипа, не нарушая морфологической целостности растений. Возможно, она специфически влияет на другие признаки, но не на интенсивность побегообразования и регенерацию побегов из стеблевых эксплантов.

Дальнейшее внимание мы сконцентрировали на *L. vulgaris* и *L. cretica*, поскольку именно у них обнаружена экспрессия изучаемого гена. Эти два вида исследовали по способности регенерировать побеги из эксплантов корней *in vitro*. Контролем в данном эксперименте служил вид *L. maroccana*, не содержащий Т-ДНК. Как видно из диаграмм на рис. 3 (a-e), только *L. vulgaris* способна формировать побеги из корневых эксплантов на среде без гормонов (см. рис. 3, a, z). Экспланты двух других видов только образовывали боковые корни на этой среде (см. рис. 3, a, d). *L. maroccana* не образовывала побегов ни на одной из сред, а *L. cretica* формировала побеги из каллусной ткани, полученной на среде с ауксином НУК и цитокинином БАП.

Интересно отметить, что при культивировании на питательных средах на свету корневые экспланты *L. vulgaris* сначала приобретали зеленую окраску, а потом начинали регенерировать побеги и/или образовывать каллусы. Боковые корни, образованные на эксплантах, сначала имели белую окраску, а потом тоже зеленели и образовывали каллусы и побеги, что, по всей видимости, — проявление способности льнянки обыкновенной вегетативно размножаться корневыми отпрысками.

В корнях и регенерировавших из них побегах проведена оценка уровня экспрессии гена *rolC*. Результаты представ-

лены на рис. 3, e. Показано, что экспрессия повышается в зеленых корнях, т. е. усиление экспрессии наблюдается совместно с активацией регенерационных процессов в корневых эксплантах. Требуется дополнительное исследование, чтобы понять, как связана регенерация из корневых отпрысков с экспрессией гена *rolC* у *L. vulgaris*.

Таким образом, в настоящей работе мы показали, что у льнянок *L. cretica* есть гомолог гена *rolC*, способный кодировать полноразмерный пептид, ген *rolC* клТ-ДНК экспрессируется у льнянок. Сопоставляя наши предыдущие эксперименты с полученными результатами, можно предположить, что ген *rolC* экспрессируется в почках. Гипотеза связана с тем, что транскрипта не обнаружено в междоузлиях и листьях (Matveeva et al., 2012), но он выявлен в молодых побегах. В таком случае меньшее количество транскрипта *rolC* у *L. cretica* по сравнению с *L. vulgaris* может быть обусловлено в том числе и более низким соотношением биомассы почек по отношению к массе побега. Особый интерес вызывает способность *L. vulgaris* формировать побеги на корневых эксплантах, а также увеличение экспрессии гена *rolC* в ходе этого процесса. Обсуждая данные, можно предполагать, что широкое распространение *L. vulgaris* связано с ее высокой способностью к размножению корневыми отпрысками, в которую вносит свой вклад экспрессия гена *rolC* клТ-ДНК. Вместе с тем следует отметить, что уровень экспрессии *rolC* был сравнительно низким во всех тканях, где его удалось обнаружить. Аналогично у табака и багата гены клТ-ДНК экспрессируются на низком уровне (Kyndt et al.,

2015; Chen, Otten, 2017). С этим, скорее всего, связано отсутствие каких-либо видимых морфологических отличий природно-трансгенных видов от других растений.

Закключение

В настоящей работе мы показали, что у *L. cretica* имеется гомолог гена *rolC*, способный кодировать полноразмерный пептид. Ген *rolC* экспрессируется в культуре растений *in vitro* в побегах, корнях и каллусах *L. vulgaris*, а также в побегах *L. cretica*. Таким образом, клТ-ДНК льнянок функциональна, а значит, ее закрепление в геномах могло играть эволюционную роль.

Acknowledgments

This work was carried out at the Shared Access Center "Development of molecular and cell technologies", St.-Petersburg State University and supported by the Russian Science Foundation, project 16-16-10010. The authors are grateful to Prof. L.A. Lutov for valuable discussion and remarks in manuscript preparation.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Chen K., Dorlhac de Borne F., Szegedi E., Otten L. Deep sequencing of the ancestral tobacco species *Nicotiana tomentosiformis* reveals multiple T-DNA inserts and a complex evolutionary history of natural transformation in the genus *Nicotiana*. *Plant J.* 2014;80(4):669-682.
- Chen K., Otten L. Natural agrobacterium transformants, recent results and some theoretical considerations. *Front. Plant Sci.* 2017. DOI 10.3389/fpls.2017.01600.
- Draper J., Scott R., Armitage P., Walden R. *Plant Genetic Transformation and Gene Expression: A Laboratory Manual*. Oxford: Blackwell Sci., 1988. (Russ. ed.: Dreyer Dzh., Skott R., Armitidzh F., Uolden R. *Gennaya inzheneriya rasteniy. Laboratornoe rukovodstvo*. Moscow: Mir Publ., 1991).
- Furner I.J., Huffman G.A., Amasino R.M., Garfinkel D.J., Gordon M.P., Nester E.W. An *Agrobacterium* transformation in the evolution of the genus *Nicotiana*. *Nature*. 1986;319(6052):422-427.
- Intrieri M.C., Buiatti M. The horizontal transfer of *Agrobacterium rhizogenes* genes and the evolution of the genus *Nicotiana*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2001;20:100-110. DOI 10.1006/mpev.2001.0927.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016;33:1870-1874. DOI 10.1093/molbev/msw054.
- Kyndt T., Quispe D., Zhai H., Jarret R., Ghislain M., Liu Q., Gheysen G., Kreuze J.F. The genome of cultivated sweet potato contains *Agrobacterium* T-DNAs with expressed genes: An example of a naturally transgenic food crop. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015; 112(18):5844-5849. DOI 10.1073/pnas.1419685112.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*. 2001;25(4):402-408.
- Lutova L.A., Bondarenko L.V., Buzovkina I.S., Levashina E.A., Tikhodeyev O.N., Khodjayova L.T., Sharova N.V., Shishkova S.O. Role of the genotype in plant regeneration processes. *Genetika = Genetics (Moscow)*. 1994;30(8):1065-1074. (in Russian)
- Matveeva T.V., Bogomaz D.I., Pavlova O.A., Nester E.W., Lutova L.A., Horizontal gene transfer from genus *Agrobacterium* to the plant *Linaria* in nature. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2012;25:1542-1551. DOI 10.1094/MPMI-07-12-0169-R.
- Matveeva T.V., Lutova L.A. Horizontal gene transfer from *Agrobacterium* to plants. *Front. Plant. Sci.* 2014;5:326. DOI 10.3389/fpls.2014.00326.
- Matveeva T.V., Sokornova S.V. Biological traits of naturally transgenic plants and their evolutionary roles. *Russ. J. Plant Physiol.* 2017;64: 635-648. DOI 10.1134/S1021443717050089.
- Meyer A.D., Ichikawa T., Meins F. Horizontal gene transfer: regulated expression of tobacco homologue of the *Agrobacterium rhizogenes rolC* gene. *Mol. Gen. Genet.* 1995;249:265-273. DOI 10.1007/BF00290526.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 1962;15:165-170.
- Nagata N., Kosono S., Sekine M., Shinmyo A., Syono K. Different expression patterns of the promoters of the NgrolB and NgrolC genes during the development of tobacco genetic tumors. *Plant Cell Phys.* 1996;37:489-498. DOI 10.1093/oxfordjournals.pcp.a028971.
- Terentyev P.V., Rostova N.S. *Praktikum po biometrii [Workshop on Biometrics]*. Leningrad: LGU Publ., 1977. (in Russian)
- Vain P. Thirty years of plant transformation technology development. *Plant Biotechnol. J.* 2007;5:221-229. DOI 10.1111/j.1467-7652.2006.00225.x.
- White F.F., Garfinkel D.J., Huffman G.A., Gordon M.P., Nester E.W. Sequence homologous to *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in the genomes of uninfected plants. *Nature*. 1983;301:348-350. www.plantarium.ru. Accessed on 1.09.2017.
- www.isaaa.org. Accessed on 3.09.2017.



Протокол работы с информационной системой по биоресурсным коллекциям институтов ФАНО России на примере коллекции микроорганизмов

Ф.В. Казанцев^{1, 2}, А.А. Смирнова¹, А.С. Розанов¹, Ю.Е. Уварова¹, Д.А. Афонников^{1, 2}, С.Е. Пельтек¹, С.А. Лашин^{1, 2}

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

Во многих научных организациях России имеются коллекции микроорганизмов, по которым накоплены большие объемы информации. Эти данные представляют описание объектов разной природы (бактерии, археи, грибы, протисты) и их свойств, которые были собраны и каталогизированы поколениями исследователей. Не каждая организация, располагающая такими коллекциями, имеет электронный каталог с открытым доступом, что осложняет работу с этими уникальными материалами для самих держателей коллекций, приводит к фактическому отсутствию доступа к биологическим образцам для широкого круга сторонних исследователей. В целях облегчения обмена информацией между держателями коллекций из разных организаций и сообществом исследователей требуется разработка обобщенного электронного каталога коллекций микроорганизмов, обеспечивающего единообразный свободный доступ научного сообщества к информации возможно большего списка коллекций. Для объединения информации по коллекциям микроорганизмов в рамках проекта по созданию информационной системы для биоресурсных коллекций институтов ФАНО России (<http://www.biores.cytogen.ru>) создан портал биоресурсных коллекций микроорганизмов (<http://www.biores.cytogen.ru/microbes/>), который является площадкой, на которой организации-держатели коллекций могут разместить информацию о единицах хранения своих коллекций, а также другие данные по коллекциям, включая ссылки на собственные каталоги. В настоящей статье мы описываем принципы работы с порталом в рамках направления коллекций микроорганизмов. Графический интерфейс портала позволяет получать пользователям, как зарегистрированным, так и незарегистрированным, следующую информацию о коллекциях микроорганизмов: список коллекций, представленных в базе данных, контактные данные организации и сведения о кураторе коллекции, сводную статистику по каждой из них, а также информацию о единицах хранения. Зарегистрированные пользователи-держатели коллекций имеют возможность создавать и модифицировать записи о единицах хранения своих коллекций, а также актуализировать их описание. Для автоматизации работы с порталом реализован также доступ к базе данных посредством программного протокола (REST API, <http://api.biores.cytogen.ru/microbes/>). В настоящее время происходит наполнение портала, который уже содержит описание более чем 13 тыс. единиц хранения (из них 3.5 тыс. приходится на биоресурсные коллекции микроорганизмов) 65 биоресурсных коллекций организаций ФАНО России (из них 12 коллекций микроорганизмов с суммарным разнообразием фондов порядка 50000 штаммов).

Ключевые слова: биоресурсная коллекция; база данных; интернет-портал; микробиологическая коллекция.

Information system on microbial collections as a part of bioresource collections portal for Russia's FASO organizations: a working protocol

F.V. Kazantsev^{1, 2}, A.A. Smirnova¹, A.S. Rozanov¹, Yu.E. Uvarova¹, D.A. Afonnikov^{1, 2}, S.E. Peltek¹, S.A. Lashin^{1, 2}

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia
² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Nowadays, many scientific organizations of Russia own collections of microorganisms on which large volumes of information have been generated. These data represent the descriptions of objects of diverse nature (bacteria, archaea, fungi, protists) and their properties, which have been carefully collected and cataloged by generations of researchers. Not every organization that has such collections has an open access electronic catalog, which not only complicates work with these unique materials, but also even hides the fact of the existence of such collections. This state of affairs requires the development of electronic resources for presenting these materials to the scientific community. To put together the information on microorganism collections, we have developed an internet portal (<http://www.biores.cytogen.ru/microbes/>) of microbial bioresource collections of FASO organizations in the Russian Federation. The portal was created under the project developing the information system for bioresource collections of FASO institutes. It is a platform where collection organizations can place information about the storage units of their collections, as well as other information on collections, including links to their own catalogs. In this paper, we describe the principles of working with the portal. The portal's graphical interface allows users, both registered and unregistered, to receive the following information about collections of microorganisms: a list of collections represented in the database, contact details of the organization and information about the curator of the collection, summary statistics for each collection, as well as information on storage units. Registered users – owners of collections – have the opportunity to create and modify records about the storage units of their collections, and to update their description. To automate work with the portal, software access to the database through the REST API has been implemented (<http://api.biores.cytogen.ru/microbes/>). At present, the portal is still being filled, but it already contains a description of more than 13,000 items of storage (of which 3500 are in the microorganisms' part)



of 65 bioresource collections in Russia's FASO organizations. Of these collections, 12 with microorganisms have a total diversity of funds of about 50,000 strains).

Key words: bioresource collection; database; internet portal; microbial collection.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Казанцев Ф.В., Смирнова А.А., Розанов А.С., Уварова Ю.Е., Афонников Д.А., Пельтек С.Е., Лашин С.А. Протокол работы с информационной системой по биоресурсным коллекциям институтов ФАНО России на примере коллекции микроорганизмов. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(2):279-284. DOI 10.18699/VJ18.361

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Kazantsev F.V., Smirnova A.A., Rozanov A.S., Uvarova Yu.E., Afonnikov D.A., Peltek S.E., Lashin S.A. Information system on microbial collections as a part of bioresource collections portal for Russia's FASO organizations: a working protocol. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(2):279-284. DOI 10.18699/VJ18.361 (in Russian)

Белки, катализаторы, биологически активные вещества, биотопливо и биополимеры, полученные на основе синтеза в клетках микроорганизмов, широко применяются во многих отраслях экономики, таких как пищевая промышленность, сельское хозяйство, текстильная промышленность, медицина, химическая промышленность, энергетика и др. Основой производства этих веществ служат штаммы-суперпродуценты, выделенные из природных источников и адаптированные для производственных целей путем селекции (Wang et al., 2001) или метаболической инженерии (Larkum et al., 2012; Lee, Kim, 2015). Современная генетическая инженерия, основанная на применении методов системной биологии, позволяет успешно оптимизировать выход биологического продукта у микроорганизмов (Розанов и др., 2014). Однако этап первичного скрининга штаммов на способность к продукции того или иного метаболита остается одним из важнейших и во многом определяет успех дальнейшей работы по созданию суперпродуцентов (Schallmeyer et al., 2014; Xiao, Lu, 2014). Источником первичного материала для создания штаммов, применяемых в практике и научных исследованиях, служат коллекции микроорганизмов (биоресурсные коллекции), полученных из различных местообитаний. Такие коллекции содержат штаммы вирусов, бактерий, грибов или протистов, которые являются таксономически определенными, хорошо охарактеризованными физиологически, а также генетически стабильными, аутентичными, контролируемыми и воспроизводимыми на больших отрезках времени, при этом их свойства хорошо задокументированы (Overmann, 2015). Повышенный интерес к коллекциям микроорганизмов не случаен и обусловлен активным поиском новых метаболических путей и особых механизмов адаптации к условиям, значительно отличающимся от обычных. Например, богатейшим источником новых ферментов и метаболитов для промышленности, науки и медицины являются экстремофилы (Chen, Jiang, 2018).

Коллекции микроорганизмов представлены в различных странах и научных центрах, большинство из них описаны на сайте Всемирной федерации коллекций культур (WFCC, <http://www.wfcc.info/home/>) (Sun et al., 2015). В настоящее время во многих научных организациях России имеются также коллекции микроорганизмов, по которым накоплены большие объемы информации. Эти данные содержат описание объектов разной природы и их свойств, которые были бережно собраны и каталогизированы поколениями исследователей. Не каждая организация,

обладающая такими коллекциями, имеет электронный каталог с открытым доступом, что осложняет работу с этими уникальными материалами для самих держателей коллекций и приводит к фактическому отсутствию доступа к биологическим образцам для широкого круга сторонних исследователей. Такое положение дел требует разработки и создания электронных ресурсов для их предоставления научному сообществу.

В области исследования микроорганизмов существуют каталоги с описанием коллекций, но, как правило, используемые в них форматы описания данных часто содержат недостаточно информации о единицах хранения. В России довольно много организаций, поддерживающих подобные коллекции. Среди них:

- Всероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ), ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пущино (<http://www.vkm.ru/rus/index.htm>);
- Коллекция микроорганизмов UNIQEM, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва (<http://www.fbras.ru/katalog-kollekcii-mikroorganizmov-uniqem>);
- Коллекция микроорганизмов для виноделия «Магарач», ФГБУН Всероссийский научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» РАН, Ялта (<http://magarach-institut.ru/institut/kollekcziya-mikroorganizmov-vinodeliya-lmagarachr.html>);
- Региональная профилированная коллекция алканотрофных микроорганизмов, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, Пермь (<http://iegmc.ru/>) и др.

Как правило, эти ресурсы нацелены на хранение коллекции одной отдельной организации и имеют достаточно подробные форматы описания единиц хранения. Несмотря на то что принцип работы с такими коллекциями достаточно стандартен, работа с десятком ресурсов затруднительна, если необходимо обращаться к ним для оперативного проведения биологических исследований или написания обзорных статей. Таким образом, актуальной задачей стало объединение биоресурсных каталогов с унифицированным интерфейсом обработки данных, предоставляющих средства приведения данных к унифицированному формату, и площадки по каталогизации и хранению данных.

Для объединения данных по коллекциям микроорганизмов в рамках проекта по созданию информационной системы для биоресурсных коллекций институтов ФАНО России создан портал биоресурсных коллекций микроорганизмов, который является площадкой, на которой орга-

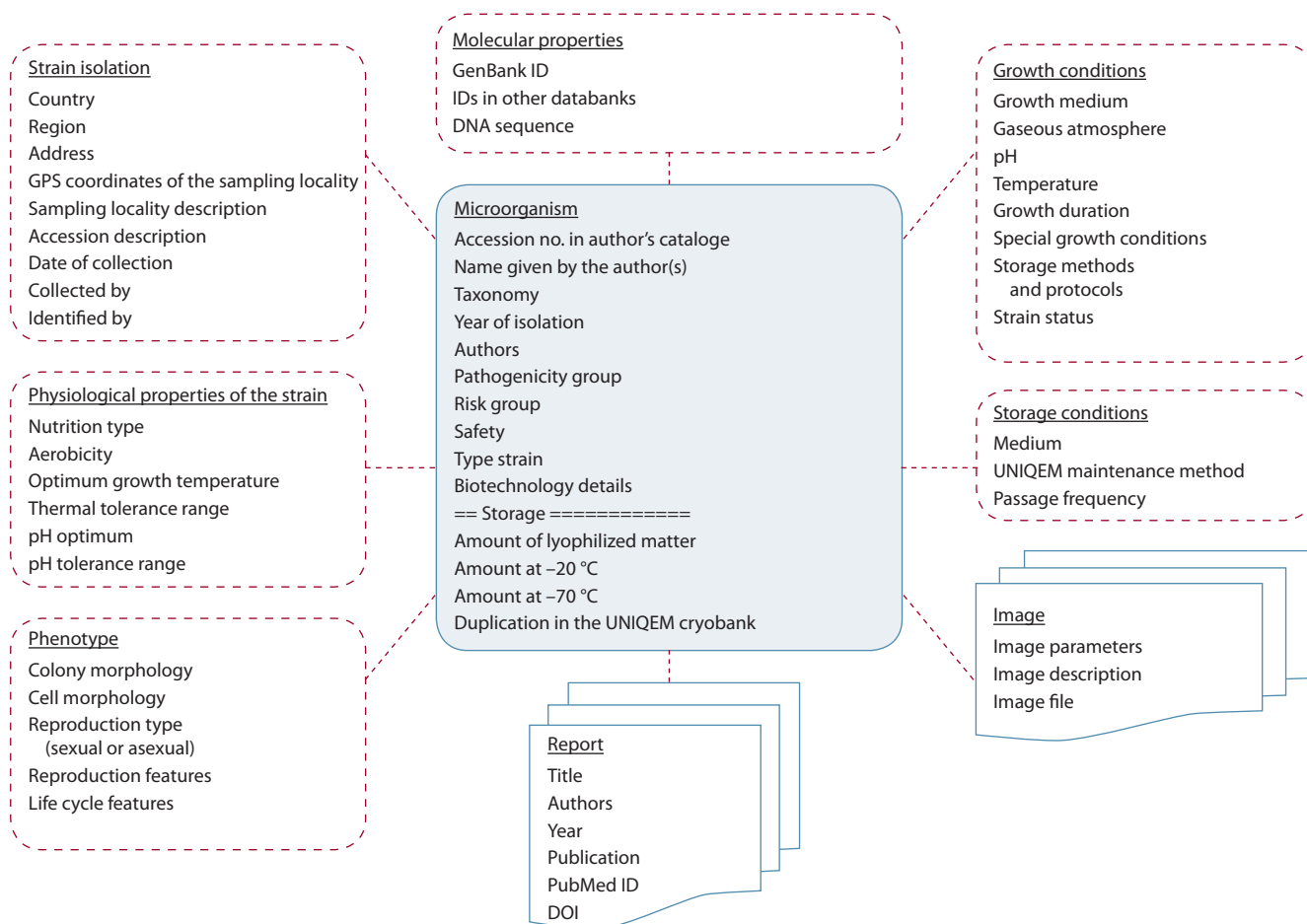


Fig. 1. Description of an accession in the microbial collection.

низации-держатели коллекций могут разместить данные о единицах хранения своих коллекций, а также другую информацию по коллекциям, включая ссылки на собственные каталоги. В этой статье мы описываем принципы работы с порталом в рамках направления коллекций микроорганизмов.

Материалы и методы

Описание единицы хранения базы данных микроорганизмов

Описание единицы хранения коллекции в базе данных включает несколько информационных блоков (рис. 1).

- **Паспортные данные.** Содержит информацию о номере образца в реестре, его таксономическое положение, характеристику патогенности микроорганизма и его биотехнологических свойств. Указываются количество сохраняемого образца (при различных режимах хранения) и информация о наличии дубликатов.
- **Данные о сборе образца** включают расположение и характеристику места сбора, а также список лиц, выделивших и описавших образец.
- **Условия культивирования.** Служит для описания среды и физиологических параметров культивирования, методов и режимов консервации, особых требований к условиям культивирования.

- **Условия сохранения.** Содержит параметры хранения культуры.
- **Физиологические свойства образца.** Содержит информацию о типе питания, оптимальных параметрах для поддержания жизнедеятельности штамма.
- **Молекулярно-генетическая информация.** Содержит информацию об имеющихся геномных последовательностях образца со ссылками на соответствующие базы данных.
- **Фенотипические характеристики.** Дает описание свойств колоний, морфологии клеток, особенностей жизненного цикла.
- **Ссылки на литературные источники.** Содержит данные о публикациях, связанных с образцом (выходные данные журнала, список авторов, ссылка на идентификатор базы PubMed и DOI).
- **Изображения.** Для образца может быть представлено несколько изображений различного характера: внешний вид образца, фотографии геля после электрофореза ДНК, изображения пиков масс-спектрограмм и др.

Реализация базы данных и интерфейса пользователя

База данных каталога коллекций реализована при помощи системы управления базами данных (СУБД) PostgreSQL (<https://www.postgresql.org>). Графический интерфейс поль-

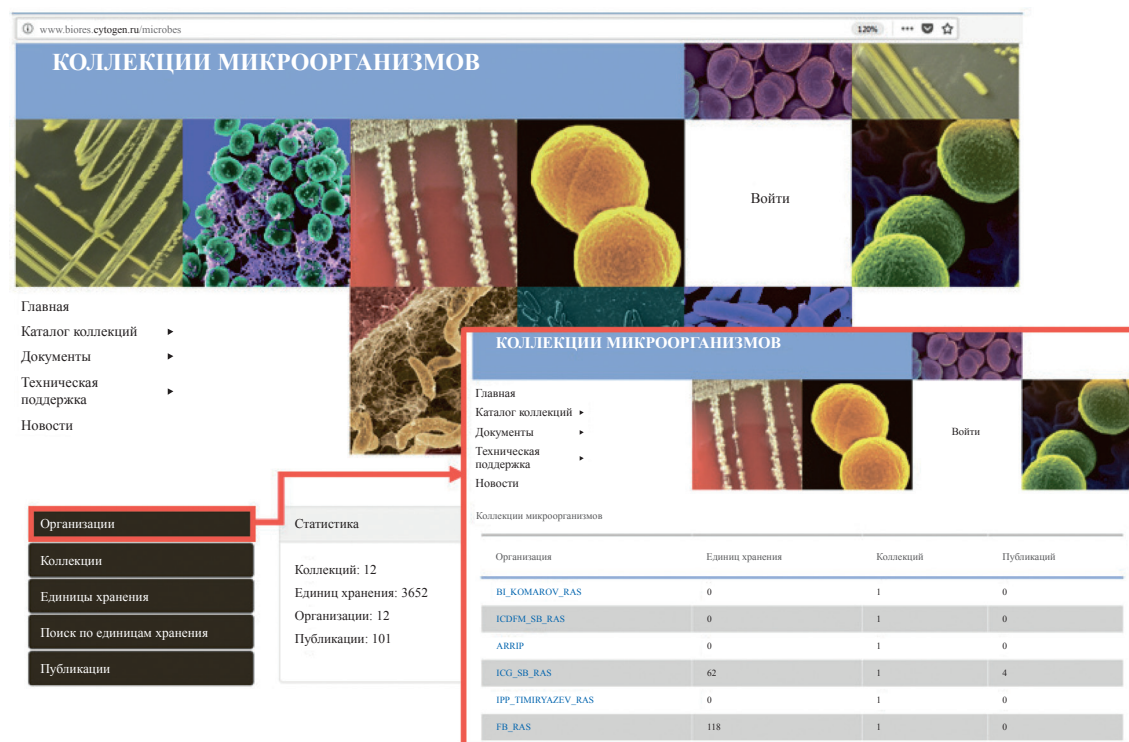


Fig. 2. Graphical user interface of the microbial collections portal.

зователя разработан по схеме Модель–Контроллер–Представление (МКП). Доступ к данным осуществляется через модуль программного интерфейса на основе технологии Representational State Transfer (REST) в специальном формате удаленных запросов к базам данных через Интернет. Программный модуль, обеспечивающий этот интерфейс, реализован на языке Java с применением библиотек Spring (<http://spring.io/>). Графический Web-интерфейс пользователя реализован с использованием инструментария и библиотек DRUPAL 7.0 (<https://www.drupal.org>).

Результаты

Доступ к базе данных. База данных коллекций микроорганизмов доступна по адресу: http://www.biores.cytogen.ru/portal_microbes_collections (короткая ссылка – <http://tiny.cc/wfx8qy>). Незарегистрированный пользователь может получить следующую информацию о коллекциях микроорганизмов: список коллекций, представленных в базе данных, контактные данные организации и сведения о кураторе коллекции, сводную статистику по каждой из них, а также информацию о единицах хранения.

Чтобы информация о новой коллекции была внесена в базу данных и отображалась на портале, необходима регистрация на сайте. Для регистрации необходимо послать заявку администрации портала с указанием лиц, ответственных за поддержание коллекции и свои контактные данные. Зарегистрированный пользователь получает права редактирования информационной карточки своей коллекции (включая контактную информацию и краткое описание коллекции), права на создание и редактирование записей, соответствующих единицам хранения. Для редактирования информации о коллекции можно подключить

несколько пользователей с разграничением ролей: оператор – пользователь(-ли), который вводит/редактирует данные коллекции; куратор коллекции – пользователь, который следит за актуальностью и корректностью введенной операторами информации.

Работа с графическим интерфейсом пользователя.

При входе на портал (<http://www.biores.cytogen.ru/>) пользователь попадает на главную страницу, которая содержит информацию о портале, новости и т. д. (рис. 2). На этой же странице пользователь может авторизоваться (если уже зарегистрирован на портале).

Для того чтобы перейти к интересующей коллекции, пользователь должен выбрать ее из раздела «Каталог коллекций» в меню портала. В результате пользователь попадает на страницу описания коллекции, содержащую контактную информацию о держателе коллекции (которая была введена держателями этой коллекции) и сводную информацию о ее размере.

Чтобы получить информацию о единицах хранения коллекции, нужно выбрать ссылку «Перейти к коллекции», находящуюся под названием коллекции. Данная ссылка может отсутствовать в случае, если организация не разместила информацию о единицах хранения на портале. Если организация имеет собственный электронный каталог, в разделе описания коллекции возможно добавление ссылок на собственный электронный ресурс.

Пользователь попадает на страницу со списком единиц хранения коллекции, сводной статистикой, ссылкой на список публикаций, ассоциированных с этой коллекцией. В списке единиц хранения отображается краткая информация: название штамма, описание образца и место, откуда он был взят.

REST requests to the microbial collection database

URL request	Description
http://api.biores.cytogen.ru/microbes/	Shows a list of API methods and examples of usage.
http://api.biores.cytogen.ru/microbes/stat	3Requests currents statistics of the database.
http://api.biores.cytogen.ru/microbes/collections	Requests a list of registered collections on the portal. Returns both collections identifiers and information on the number of depository units and publications.
http://api.biores.cytogen.ru/microbes/collections/id_col	Requests information about collection with id_col identifier. Returns information on the number of depository units and publications.
http://api.biores.cytogen.ru/microbes/collections/id_col/entities	Requests a list of all depository items stored in a certain collection with id_col identifier. Returns a list of short descriptions.
http://api.biores.cytogen.ru/microbes/collections/id_col/entities/id_entity	Requests the full description of a certain depository item from a particular collection (collection identifier id_col, depository item identifier id_entity).
http://api.biores.cytogen.ru/microbes/publications	Requests a list of all publications registered on the portal. For each publication, associated depository items can be requested.
http://api.biores.cytogen.ru/microbes/images	Requests a list of all images registered on the portal. For each image, associated depository items can be requested.

Выбрав элемент из списка, пользователь переходит на страницу с полным описанием карточки единицы хранения, содержащей следующие разделы: основные характеристики штамма, информация о выделении штамма, условия культивирования, молекулярно-генетические свойства, фенотип, физиология, условия хранения, описание таксономии, изображение (важные характеристики штамма, представленные в графическом виде).

Регистрация и пополнение информации о коллекциях. Чтобы ввести информацию коллекции на портале, необходимо зарегистрироваться. Для этого необходимо связаться с администрацией портала по адресу: biores-support@bionet.nsc.ru. После подтверждения регистрации пользователь может вносить правки.

Для авторизации на портале (<http://www.biores.cytogen.ru/>) пользователю нужно:

- 1) перейти по ссылке «Войти», расположенной в правой верхней части страницы;
- 2) ввести в форму полученные при регистрации логин и пароль, после чего пользователь попадает на страницу своей учетной записи, где ему доступна возможность ее редактирования;
- 3) редактирование информации о коллекции доступно пользователям с правом внесения первичной информации в конкретную базу данных биоресурсной коллекции. Для этого пользователь должен перейти к коллекции через раздел «Каталог коллекций» главного меню портала, где по ссылке «Редактировать» пользователю открывается форма для внесения и редактирования описания коллекции;
- 4) при переходе к списку единиц хранения коллекции пользователю с правом внесения первичной информации в конкретную базу данных биоресурсной коллекции

доступна ссылка для внесения новой карточки единицы хранения и редактирования уже существующих.

Программный доступ к данным коллекций. Для решения задач компьютерного поиска и сбора статистики по данным портала биоресурсных коллекций реализован программный интерфейс доступа (Application Programming Interface, API) по технологии REST. В случае базы данных коллекций микроорганизмов интерфейс расположен по адресу (<http://api.biores.cytogen.ru/microbes/>). REST API позволяет получать необходимую информацию через серию URL запросов. Данные из базы возвращаются в виде структурированного текста в формате JSON (<http://json.org/>). JSON-объект может быть открыт любым текстовым редактором или обработан одним из множества программных инструментов. Большинство универсальных сред моделирования (Matlab, Scilab и др.) и сред программирования на языках высокого уровня, таких как Python, R, C++, Java, имеют инструментарию по работе с JSON текстами. Пример работы с базой данных через REST API на языке Python можно найти в работе (Kazantsev et al., 2017).

REST API портала имеет набор унифицированных запросов для выводов информации различного типа. В таблице описан формат формирования таких запросов. Запросы могут быть выполнены в строке Интернет-браузера или приложения, написанного на каком-либо языке программирования.

Содержание портала. В настоящее время база данных коллекций микроорганизмов включает описание 3.5 тыс. единиц хранения из 12 микробиологических коллекций ФАНО России с суммарным разнообразием фондов порядка 50000 штаммов. Ведется его активное наполнение.

Заключение

Разработку и наполнение информационных ресурсов, подобных portalу, представленному в нашей статье, можно рассматривать в нескольких аспектах. С одной стороны, хранение информации о микробиологических ресурсах организаций России и их фондах в единой базе данных с унифицированным описанием единиц хранения и с унифицированным же доступом к данным имеет большое утилитарное значение для различных отраслей отечественной микробиологии. С другой стороны, анализ всего содержимого базы данных с помощью современных методов работы с большими данными, несомненно, будет иметь и фундаментальное значение.

Acknowledgments

This work was supported by the Federal Agency for Scientific Organizations, program for the support of bioresource collections, project 0324-2017-0050.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Chen G.Q., Jiang X.R. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2018;50:94-100. DOI 10.1016/j.copbio.2017.11.016.
- Kazantsev F., Akberdin I., Lashin S., Ree N., Timonov V., Ratushny A., Khlebodarova T., Likhoshvai V. MAMMOTH: a new database for curated MAtheMatical Models of bioMOlecular sysTems. *J. Bioinform. Comput. Biol.* 2017. DOI 10.1142/S0219720017400108.
- Larkum A.W., Ross I.L., Kruse O., Hankamer B. Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production. *Trends Biotechnol.* 2012;30(4):198-205. DOI 10.1016/j.tibtech.2011.11.003.
- Lee S.Y., Kim H.U. Systems strategies for developing industrial microbial strains. *Nat. Biotechnol.* 2015;33(10):1061-1072. DOI 10.1038/nbt.3365.
- Overmann J. Significance and future role of microbial resource centers. *Syst. Appl. Microbiol.* 2015;38(4):258-265. DOI 10.1016/j.syapm.2015.02.008.
- Rozanov A.S., Kotenko A.V., Akberdin I.R., Peltek S.E. Recombinant strains of *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production from plant biomass. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2014;18(4/2):989-998. (in Russian)
- Schallmeyer M., Frunzke J., Eggeling L., Marienhagen J. Looking for the pick of the bunch: high-throughput screening of producing microorganisms with biosensors. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2014;26:148-154.
- Sun Q., Liu L., Wu L., Li W., Liu Q., Zhang J., Ma J. Web resources for microbial data. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2015;13(1):69-72. DOI 10.1016/j.gpb.2015.01.008.
- Xiao Z., Lu J.R. Strategies for enhancing fermentative production of acetoin: a review. *Biotechnol. Adv.* 2014;32(2):492-503. DOI 10.1016/j.biotechadv.2014.01.002.
- Wang Z., Zhuhe J., Fang H., Prior B.A. Glycerol production by microbial fermentation: a review. *Biotechnol. Adv.* 2001;19(3):201-223. DOI 10.1016/S0734-9750(01)00060-X.



Taxonomic assessment of the *Oxytropis* species from South-East of Kazakhstan

S. Almerekova^{1, 2}, S. Abugalieva^{1, 2}✉, N. Mukhitdinov²

¹ Institute of Plant Biology and Biotechnology, Almaty, Kazakhstan

² Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

The genus *Oxytropis* DC. is one of the largest genera in the Fabaceae family. The most plant species belonging to the *Oxytropis* genus have an important medicinal value. Currently the botanical taxonomy of the genus is complicated due to existence of many subgenera and sections that developed based on morphological traits. Also, in the literature there is lack of knowledge on phylogeny of *Oxytropis* species from Central Asian region. Therefore, the purpose of the present study was the clarification of taxonomic relationship of two *Oxytropis* species from South-East of Kazakhstan (*O. almaatensis* Bajt. and *O. glabra* DC.). The study was based on using phylogenetic analysis and haplotype network assessment based on sequences ITS (internal transcribed spacers), which is DNA marker of nuclear genome. Plant materials of *O. almaatensis* were collected from 2 populations in two neighboring Gorges in Trans Ili Alatau Mountains, *O. glabra* plant material was obtained from Herbarium of the Department of Biodiversity and Bioresources, al-Farabi Kazakh National University. Based on DNA sequences of ITS the phylogenetic and network relationships were investigated by using Neighbor Joining and Median Joining methods, respectively. The nucleotide sequences of ITS of *O. almaatensis* and *O. glabra* were aligned with sequences of 29 *Oxytropis* references found in the NCBI database. Out of the 601 aligned positions of ITS 33 (5.6 %) sites were found to be polymorphic nucleotides and used in evaluation of the genetic relationship of species. Constructed MJ haplotype network showed a very high congruence with the NJ phylogenetic tree. MJ network provided valuable additional hints in clarification of the taxonomic relationship among species involved in the analysis. In this study phylogenetic NJ tree and MJ network based on the variation of ITS sequences confirmed the monophyletic origin of the genus. The ITS haplotype network suggested that *O. glabra* is very diverse species and possibly played important role in the evolutionary processes of the genus in Central Asian region. The study is additional contribution in the molecular taxonomy of complex *Oxytropis* genus.

Key words: *Oxytropis*; *Oxytropis almaatensis*; *Oxytropis glabra*; DNA barcoding; haplotype network.

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Almerekova S., Abugalieva S., Mukhitdinov N. Taxonomic assessment of the *Oxytropis* species from South-East of Kazakhstan. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(2):285–290. DOI 10.18699/VJ18.362

Received 19.02.2018
Accepted for publication 07.03.2018
© AUTHORS, 2018

✉ e-mail: absaule@yahoo.com

Таксономическая оценка видов рода *Oxytropis* из Юго-Восточного Казахстана

Ш.С. Альмерекова^{1, 2}, С.И. Аbugалиева^{1, 2}✉, Н.М. Мухитдинов²

¹ Институт биологии и биотехнологии растений, Алматы, Казахстан

² Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан

Род *Oxytropis* DC. является одним из крупнейших родов семейства Fabaceae. Большинство видов растений, принадлежащих к данному роду, имеют важное лекарственное значение. В настоящее время ботаническая систематика рода затруднена в связи с наличием множества подродов и секций. Также в литературе отсутствуют данные о филогенетических взаимосвязях видов *Oxytropis* из Центральной Азии. В связи с этим целью настоящего исследования было уточнение таксономических взаимоотношений двух видов *Oxytropis* из Юго-Восточного Казахстана – *O. almaatensis* Bajt. и *O. glabra* DC. Осуществлены филогенетический анализ и оценка сети гаплотипов, базирующиеся на полиморфных последовательностях ITS (internal transcribed spacers), ДНК-маркера ядерного генома. Растительный материал *O. almaatensis* состоял из двух популяций, собранных в двух соседних ущельях Заилийского Алатау, растительный материал *O. glabra* был получен из гербарного образца кафедры биоразнообразия и биоресурсов Казахского национального университета имени аль-Фараби. Полученные полиморфные нуклеотидные последовательности ITS были использованы для анализа филогенетических взаимоотношений и сети гаплотипов с помощью методов Neighbor Joining (NJ) и Median Joining (MJ) соответственно. Последовательности ITS *O. almaatensis* и *O. glabra* сравнивали с последовательностями 29 образцов *Oxytropis*, полученными из базы данных GenBank (NCBI). Длина ITS составила 601 п. о., из них 33 (или 5.6 %) нуклеотида оказались полиморфными, что позволило использовать их в изучении генетического родства видов *Oxytropis*. В целом построенная сеть гаплотипов MJ позволила выявить высокую степень совпадения с филогенетическим древом NJ. Кроме того, применение MJ сети гаплотипов дало возможность получить ценные дополнительные данные для уточнения таксономических отношений между видами, вовлеченными в анализ. В этом исследовании филогенетическое древо и сеть гаплотипов, построенные на основе варибельности последовательностей ITS, подтвердили монофилетическое происхождение рода. Построенная сеть гаплотипов позволила предположить, что *O. glabra* является высоковарибельным видом, который, возможно, играл важную роль в эволюционном процессе рода в Центральной Азии. Исследование внесло дополнительный вклад в изучение молекулярной таксономии рода *Oxytropis*.

Ключевые слова: *Oxytropis*; *Oxytropis almaatensis*; *Oxytropis glabra*; ДНК-баркодирование; сеть гаплотипов.

Oxytropis DC. with approximately 450 species, most of which are hairy perennial plants, is one of the largest genera in the family Fabaceae (Malyshev, 2008a). *Oxytropis* species are well distributed in Central Asia and rich in endemics, especially in mountain systems of Mongolian Altay, Tien Shan, Nanshan and Himalayas (Grubov, 2003). Grubov (2003) reported that Central Asia, along with West Asia, is the most important center of the speciation of genus *Oxytropis*. In Central Asia the genus consists of all the six subgenera and sixteen sections (Grubov, 2003). In northern Tien Shan the species composition of the genus *Oxytropis* has been studied by Abdulina (1978). Morphological studies of the species found in the northern Tien Shan region were carried out, the most convenient traits for diagnostics of taxa were identified, areas of endemic species and maps of their distribution have been specified (Abdulina, 1978). According to Malyshev (2008b) the genus is represented by 6 subgenera and 25 sections. Author clustered 25 sections according to the 50 quantitative alternative morphological characters (Malyshev, 2008b). Due to a large number of *Oxytropis* species, the taxonomy of this genus is still uncompleted.

In Kazakhstan *Oxytropis* is represented by 119 species, 36 of which are endemic (Baitenov, 1961). One of those endemic plant species is *Oxytropis almaatensis* Bajt. listed in the Red Book of Kazakhstan (2014). *O. almaatensis* is a narrow endemic species of Trans Ili Alatau range which belongs to the Tien Shan Mountains (Baitenov, 1961). According to the literature *O. almaatensis* has potential medicinal benefits. It contains phenol carboxylic acid which is helpful for coronary dilatation and flavonoid ramnazine which has antihypertensive properties (Grudzinskaya et al., 2014).

The DNA barcoding significantly contributed not only in plant species identification but also in the taxonomic relationship of poorly studied species (Tehen et al., 2014; Li et al., 2015). Currently, this approach considered as an additional effective tool used in taxonomic studies of the genus *Oxytropis* (Archambault, Strömvik, 2012; Artyukova, Kozyrenko, 2012; Gao et al., 2013; Lu et al., 2014; Kholina et al., 2016; Tekpinar et al., 2016). For instance, first attempt to clarify taxonomy and biogeography of the genus in Alaska was carried out by Jorgensen (Jorgensen et al., 2003). The use of ITS (internal transcribed spacers) and RAPD (random amplified polymorphic DNA) markers has shown that north-eastern arctic populations in *O. arctica* and *O. campestris* were different from all other studied populations. The genetic subdivision probably reflects a Pleistocene barrier formed by the northern coastal ice shield (Jorgensen et al., 2003). To identify the phylogenetic relationship of Turkish *Oxytropis* species the *trnL* intron, *trnL*-F intergenic spacer, and *trnV* intron of chloroplast (cp) DNA were used (Tekpinar et al., 2016). According to Tekpinar (2016) *trnL* intron was the most variable region. Kholina et al. (2016) assessed phylogenetic relationships of Russian species of *Oxytropis* from subgenera *Oxytropis* and *Phacoxytropis* using *trnH-psbA*, *trnL-trnF*, and *trnS-trnG* intergenic spacer regions of chloroplast DNA (cpDNA) and genealogical haplotype network. This helped authors to clarify the phylogenetic relationships of the analysed species and sections within the subgenera.

In *Oxytropis* taxonomy studies, along with estimated phylogenetic trees, several successful analyses were included

haplotype network approach (Artyukova, Kozyrenko, 2012; Kholina et al., 2016, 2017). For instance, the three intergenic spacers *psbA-trnH*, *trnL-trnF*, and *trnS-trnG* of cpDNA of rare and endemic plant species of Buryatia in four populations from Barguzin and Yeravna depressions were studied (Kholina et al., 2017). Therefore, the assessment of combinations of haplotype network and phylogenetic trees might provide valuable insights into understanding the microevolutionary process for closely related species.

As in the literature there is lack of knowledge on phylogeny of *Oxytropis* species from Central Asian region, the purpose of the present study was the clarification of taxonomic relationship of two *Oxytropis* species from South-East of Kazakhstan (*O. almaatensis* Bajt. and *O. glabra* DC.). The taxonomic analysis of *Oxytropis* taxa was relied on using phylogenetic analysis and haplotype network assessment by using the variability of the ITS nucleotide sequences. The study was conducted in the frame of the nation-wide research project DNA barcoding of wild flora of Kazakhstan (Turuspekov, Abugalieva, 2015) that combined efforts of local botanists and geneticists from Biotechnology Research Organizations, Botanical Gardens, National Nature Parks and Reserves as well as project "Informational system for molecular genetic and botanical documentation of wild flora in Kazakhstan". It is another contribution to the description of the genetic variation of wild flora in Kazakhstan (Adams, Turuspekov, 1998; Turuspekov et al., 2002, 2014; Genievskaya et al., 2017).

Materials and methods

Sample collections and DNA extraction. Samples of leaves from *O. almaatensis* were collected from 2 populations in two different Gorges in Trans Ili Alatau Mountains (Big Almaty gorge and Small Almaty gorge) in 2015 and 2016, five plant samples from each population were chosen for the genetic analysis. *O. glabra* plant material was obtained from Herbarium of the Department of Biodiversity and Bioresources, al-Farabi Kazakh National University. For the construction haplotype network and phylogenetic tree ITS sequences were taken from NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). DNA was extracted using CTAB protocol (Doyle J.J., Doyle J.L., 1987) and stored at -20°C until use.

DNA amplification and sequencing. PCR fragments were amplified from nuclear ribosomal complex including ITS1 and ITS2 (White et al., 1990). PCR was performed by using Veriti Thermo cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). PCR reaction (total volume 16 μl) contained 4 mM of each dNTP, 6.4 mM of primer mix, 1.6 U of Taq DNA polymerase and 80 ng of total genomic DNA. The entire ITS-1, 5.8S, and ITS-2 region was polymerase chain reaction (PCR)-amplified using primers ITS1nF (5'-AGAAGTCGTAACAAGGTTTC CGTAGG-3') and ITS4nR (5'-TCCTCCGCTTATTGATAT GC-3') with annealing temperature 58°C (White et al., 1990). PCR products were run in 1.5 % agarose gel electrophoresis at 80 V voltage for 40 min. Single bands with expected sizes around 650 bp were cut out from gels and purified using ULTRAPrep® Agarose Gel Extraction Mini Prep Kit (AHN Biotechnologie GmbH, Nordhausen, Germany) according to the protocol provided by the company. Purified DNA amplicons were used for the sequence reactions with forward and reverse primers separately. All reactions were performed

Haplotypes formed from the analysis of ITS sequences *Oxytropis* species and the outgroup

Haplotype	Cluster and haplogroup	Species	GenBank Accession number	Sections
Hap_1	IV	<i>O. revoluta</i>	LM653251	<i>Atctobia</i>
Hap_2	IV	<i>O. retusa</i>	LM653264	<i>Orobia</i>
Hap_3	III	<i>O. racemosa</i>	HQ199320	<i>Verticillares</i>
		<i>O. ochrantha</i>	GQ422820	
Hap_4	II	<i>O. pilosa</i>	AF121759	<i>Chrysanthia</i>
Hap_5	II	<i>O. pallasii</i>	KM053395	<i>Chrysanthia</i>
Hap_6	III	<i>O. oxyphylla</i>	FR839000	<i>Verticillares</i>
		<i>O. intermedia</i>	LM653257	<i>Xerobia</i>
		<i>O. inschanica</i>	HQ199322	
Hap_7	III	<i>O. microphylla</i>	KP338205	<i>Polyadena</i>
Hap_8	III	<i>O. maydelliana</i>	HQ176486	<i>Orobia</i>
Hap_9	III	<i>O. mandshurica</i>	LM653236	<i>Janthina</i>
Hap_10	III	<i>O. lanata</i>	LM653259	<i>Verticillares</i>
Hap_11	II	<i>O. kansuensis</i>	KJ143718	<i>Mesogaea</i>
Hap_12	IV	<i>O. kamtschatica</i>	LM653247	<i>Atctobia</i>
Hap_13	IV	<i>O. hidakamontana</i>	LM653263	<i>Atctobia</i>
Hap_14	III	<i>O. filiformis</i>	HQ199321	<i>Janthina</i>
Hap_15	III	<i>O. evenorum</i>	LM653239	<i>Orobia</i>
Hap_16	II	<i>O. deflexa</i>	HQ176481	<i>Mesogaea</i>
Hap_17	III	<i>O. chankaensis</i>	FR839001	<i>Verticillares</i>
Hap_18	III	<i>O. campestris</i>	HQ176475	<i>Orobia</i>
Hap_19	III	<i>O. caerulea</i>	GU217599	<i>Janthina</i>
Hap_20	III	<i>O. borealis</i>	AF121758	<i>Gloecephala</i>
Hap_21	II	<i>O. aciphylla</i>	GQ422806	<i>Lycotriche</i>
Hap_22	I	<i>O. glabra</i>	LC213354	<i>Mesogaea</i>
Hap_23	I	<i>O. glabra</i>	KJ143729	<i>Mesogaea</i>
Hap_24	I	<i>O. glabra</i> , <i>O. glabra</i>	KJ143719, GQ265958	<i>Mesogaea</i>
Hap_25	I	<i>O. glabra</i>	GQ265961	<i>Mesogaea</i>
Hap_26	I	<i>O. glabra</i> *	In this study	<i>Mesogaea</i>
Hap_27	I	<i>O. almaatensis</i> *	MG 282028, in this study	<i>Eumorphia</i>
Hap_28	Outgroup	<i>A. polaris</i>	AF121714	–
Hap_29	Outgroup	<i>A. mollissimus</i>	AF121719	–

with the BigDye Terminator Cycle Sequencing technology (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequencing was carried out using an ABI 3130 DNA analyzer (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Sequence alignment. The ITS sequences were aligned in MEGA 6 (Tamura et al., 2013) by using Neighbor Joining method (NJ) (Saitou, Nei, 1987), the 1000 replication bootstrap test was applied. The sequences of *O. almaatensis* and *O. glabra* were aligned with other *Oxytropis* species sequences obtained from NCBI reference database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). The ITS sequences of five samples of *O. almaatensis* were identical, consequently one sample was selected for the next analysis and deposited to the NCBI database (MG 282028) (see Table).

Haplotype Network was reconstructed using the Median Joining method (Bandelt et al., 1999) in PopART v.1.7 (Leigh, Bryant, 2015). The aligned sequences were converted into Nexus file format in DNASP v5.10 (Librado, Rozas, 2009) for the operations in the PopART software (version 1.7).

Results

Phylogenetic tree analyses based on ITS sequences

The DNA sequences of ITS of *O. almaatensis* and *O. glabra* were aligned with sequences of 29 *Oxytropis* references extracted from NCBI, and *Astragalus polaris* and *Astragalus mollissimus* were chosen as the outgroup taxa. The length of ITS (including ITS1, 5.8S, and ITS2) region for *Oxytropis* was

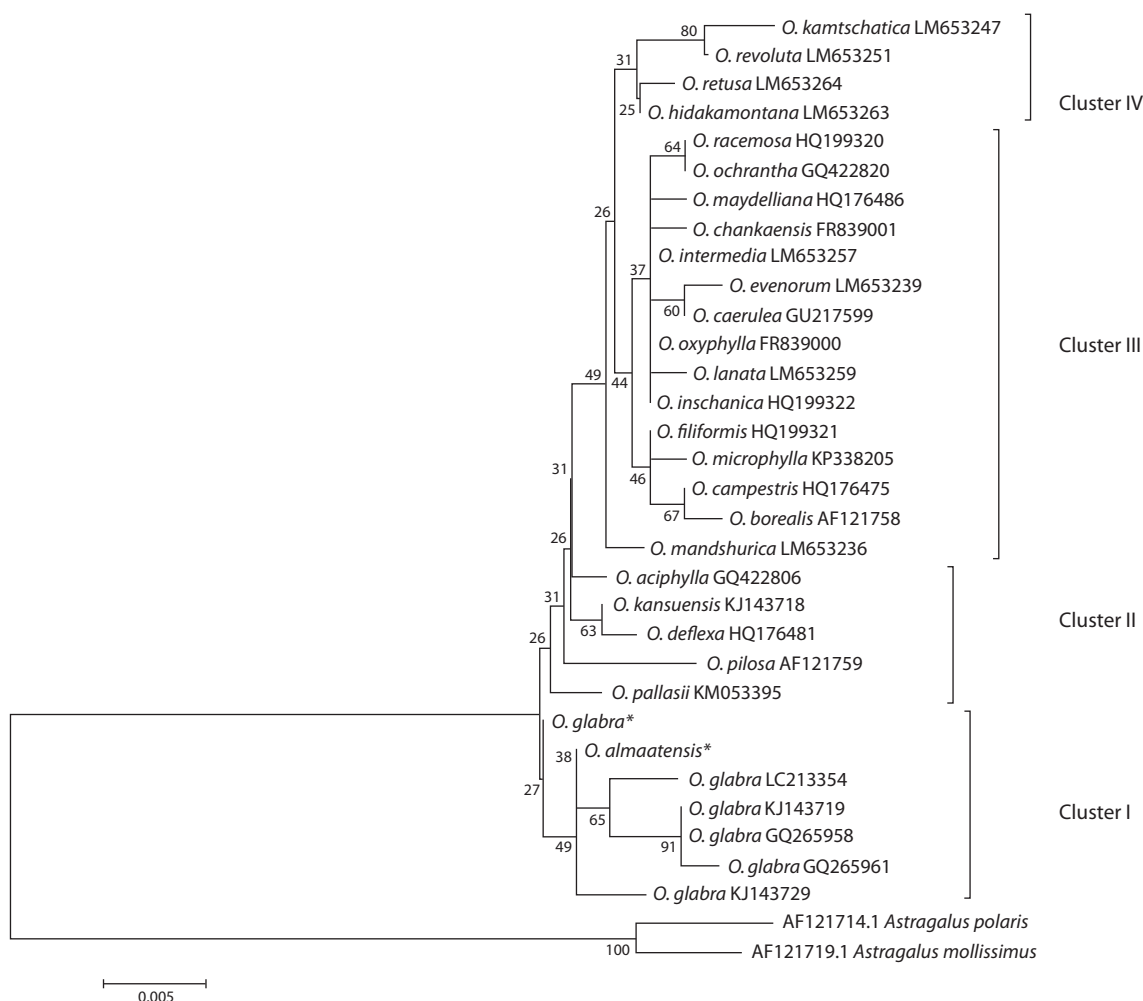


Fig. 1. Neighbor Joining phylogenetic tree reconstructed from the analysis of ITS sequences of *Oxytropis* and outgroup species.

601 bp. 33 (5.6 %) sites out of the 601 aligned positions of ITS were polymorphic without outgroup. Singleton variable sites was 16, parsimony informative sites was 17.

The ITS nucleotide dataset consisted from *O. almaatensis*, *O. glabra* sequenced in this study, as well as 29 *Oxytropis* species and two outgroup species (*A. polaris*, *A. mollissimus*) collected from the NCBI database. The NJ tree clustered all *Oxytropis* accessions into four clusters and separated from the outgroup (Fig. 1). Sequences of *O. almaatensis* and *O. glabra* grouped with five references of *O. glabra* from NCBI in Cluster I. The Cluster II grouped together *O. pallasii*, *O. pilosa*, *O. kansuensis*, *O. deflexa*, and *O. aciphylla*. The Cluster III was represented by *O. oxyphylla*, *O. intermedia*, *O. inschanica*, *O. microphylla*, *O. maydelliana*, *O. filiformis*, *O. evenorum*, *O. lanata*, *O. racemosa*, *O. ochrantha*, *O. chankaensis*, *O. campestris*, *O. caerulea*, *O. borealis*, *O. mandshurica*. The Cluster IV was represented by following species from NCBI: *O. kamtschatica*, *O. hidakamontana*, *O. revoluta*, *O. retusa*.

Haplotype network analyses based on ITS sequences

Twenty-nine haplotypes were identified for the ITS region in 33 accessions of *Oxytropis* genus and outgroup species in the network association analysis (Fig. 2). The results suggested

that $Hd = 0.991$ (haplotype diversity), $\pi = 0.01498$ (nucleotide diversity), and $k = 8.86553$ (average number of nucleotide differences). The 29 haplotypes generated four haplogroups that corresponded to the NJ phylogenetic tree.

The largest haplotype H6 included *O. oxyphylla*, *O. intermedia*, *O. inschanica* (from NCBI) in haplogroup III. The next largest haplotype H3 contained *O. racemosa*, *O. ochrantha* from NCBI from the same haplogroup III. Haplotype 24 included two references of one species *O. glabra* in haplogroup I. Local species *O. glabra* and *O. almaatensis* generated two different haplotypes, H26 and H27, respectively, in haplogroup I (see Fig. 2, Table).

Discussion

The traditional taxonomy of the genus *Oxytropis* is still unresolved and has many difficulties. Therefore the application of haplotype network and phylogenetic tree methods using polymorphic molecular markers is essential additional asset molecular taxonomy analyses of complicated genera. In this study phylogenetic NJ tree and MJ network based on the variation of ITS sequences confirmed the monophyletic origin of the genus (see Figs. 1, 2). This result is well in line with previously published results (Archambault, Strömviik, 2012;

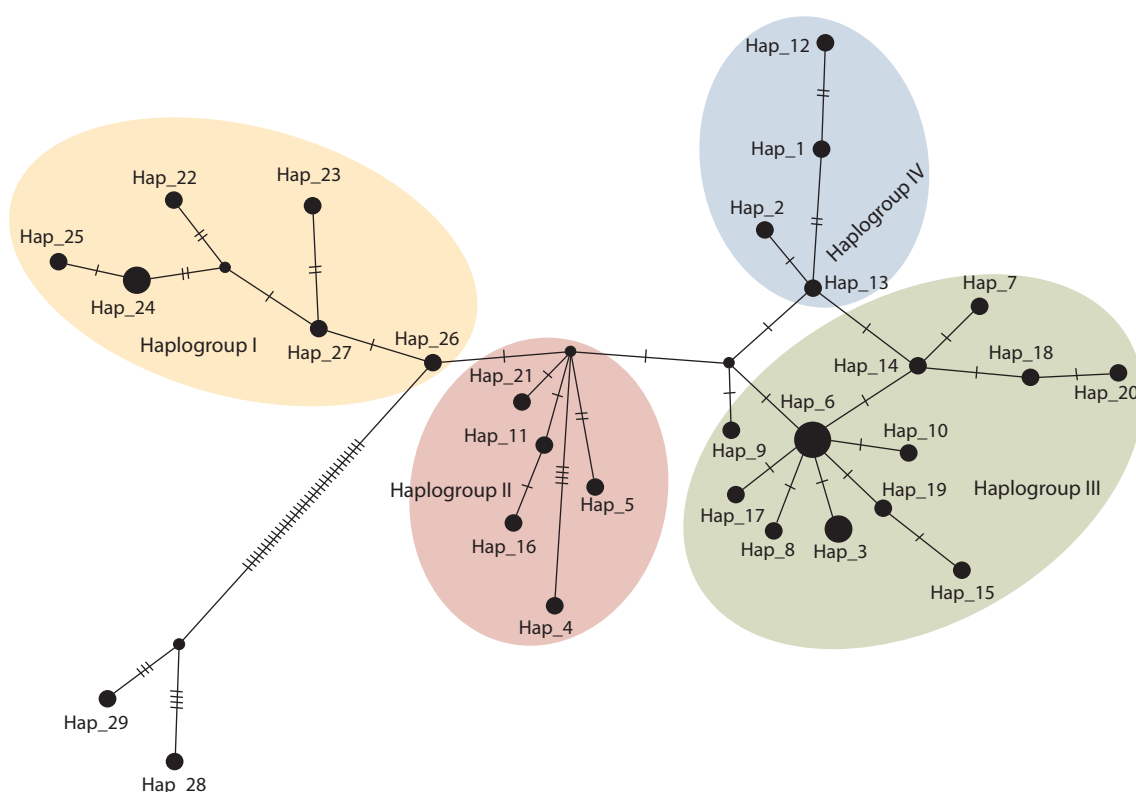


Fig. 2. The Median-joining haplotype network of ITS of *Oxytropis* and outgroup species.

Gao et al., 2013; Lu et al., 2014). The other important outcome is that the majority of species in this study formed four distinct clusters. The first cluster in the tree and first haplogroup in the network consisted only of two species, *O. glabra* and *O. almaatensis*. In general, as shown in previous studies (Archambault, Strömvik, 2012; Kholina et al., 2016) and in present work, the botanical classification is rarely coincided with produced phylogenetic trees, which is further complicate the analyses of the evolutionary processes in the genus *Oxytropis*.

The phylogenetic tree showed that *O. glabra* (section *Mesogaea*) and *O. almaatensis* (section *Eumorpha*) are genetically close to each other within the genus *Oxytropis*. This result is suggesting that there is a possibility of existence of extinct or extant group of relative species that can be evolutionary closely associated with both *O. glabra* and *O. almaatensis*. Therefore, additional studies should be done to clarify this hypothesis.

The ITS network suggested that *O. glabra* is highly polymorphic species and one of their haplotype (Hap_26) is the closest point to two outgroup species of *Astragalus* (Hap_26 and Hap_29) (see Fig. 2). As both haplotypes, Hap_26 and Hap_27, represented two genetically close species sampled in southeast Kazakhstan, it can be speculated that these regions might associate with one of the centers of diversification for this genus.

The second group of species consisted of five following species – *O. pilosa*, *O. pallasii*, *O. kansuensis*, *O. deflexa*, and *O. aciphylla*. In previously published articles the majority of these species was often clustered together with *O. glabra* (Archambault, Strömvik, 2012; Artyukova, Kozyrenko, 2012;

Kholina et al., 2016). In this study, the haplotype network separated these two groups as all five species of the second cluster were bound to the same median vector (*mv*) (see Fig. 2). Thus, it is a possibility that species may have the same extinct or extant predecessor, which is genetically close to *O. kansuensis*, *O. deflexa*, and *O. aciphylla*. Most populated groups of *Oxytropis* species formed the third cluster (haplogroup III) that has a connection to the *O. mandshurica* via a common *mv* in the network (Fig. 2). Similarly, *O. mandshurica* (Hap_9) using the same *mv* was also connected to haplogroup IV, represented by four Far East species (Kholina et al., 2016). It is interesting that the network is suggesting a close genetic relationship between *O. filiformis* (haplogroup III) and *O. hidakamontana* (haplogroup IV) despite their clasterization in different sub clades (see Fig. 2).

In general, the constructed haplotype network showed a very high congruence with the NJ phylogenetic tree. As generated NJ dendrogram showed a relatively low bootstrap value indices; the network provided valuable additional hints in clarification of the taxonomic relationship among species involved in the analysis. The study is another contribution in the molecular taxonomy of complex *Oxytropis* genus.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the funding of the grant AP05131621 from the Ministry of Education and Sciences of the Republic of Kazakhstan.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Abdulina S.A. Endemic species of the genus *Oxytropis* DC. in Northern Tien Shan. Bull. Acad. Sci. Kazakh SSR. 1978:66-71.
- Adams R.P., Turuspekov Y. Taxonomic reassessment of some Central Asian and Himalayan scale-leaved taxa of *Juniperus* (Cupressaceae) supported by random amplification of polymorphic DNA. Taxon. 1998;47:75-84.
- Archambault A., Strömvik M.V. Evolutionary relationships in *Oxytropis* species, as estimated from the nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) sequences point to multiple expansions into the Arctic. Botany. 2012;90:770-779. DOI 10.1139/b2012-023.
- Artyukova E.V., Kozyrenko M.M. Phylogenetic relationships of *Oxytropis chankaensis* Jurtz. and *Oxytropis oxyphylla* (Pall.) DC. (Fabaceae) inferred from the data of sequencing of the ITS region of the nuclear ribosomal DNA operon and intergenic spacers of the chloroplast genome. Genetika. 2012;48:186-193. DOI 10.1134/S1022795411110032.
- Baitenov M.S. *Oxytropis almaatensis* Bajt. sp. nova. Flora Kazahstana. T. V. [Flora of Kazakhstan. Vol. V]. Ed. N.V. Pavlov. Alma-Ata: Akademija Nauk Kazakhskoy SSR, 1961:330-410. (in Russian)
- Bandelt H.J., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Mol. Biol. Evol. 1999;16(1):37-48.
- Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 1987;19:11-15.
- Gao L., Lu P., Jin F., Enhebayaer E., Gao J. *TrnL*-F sequences analysis and molecular phylogeny of 10 species of *Oxytropis*. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica. 2013;2:266-271.
- Genievskaya Y., Abugalieva S., Zhubanysheva A., Turuspekov Y. Morphological description and DNA barcoding study of sand rice (*Agriophyllum squarrosum*, Chenopodiaceae) collected in Kazakhstan. BMC Plant Biology. 2017;17(Suppl.1):177. DOI 10.1186/s12870-017-1132-1
- Grubov V.I. Plants of Central Asia – Plant Collection from China and Mongolia. Vol. 8b. Legumes, Genus *Oxytropis*. Enfield Taylor & Francis, 2003.
- Grudzinskaya L.M., Gemedzhieva N.G., Nelina N.V., Karzhaubekova J.J. Annotirovannyj spisok lekarstvennyh rastenij Kazahstana: Spravochnoe izdanie [Annotated checklist of medicinal plants in Kazakhstan: a reference book]. Almaty, 2014. (in Russian)
- Jorgensen J.L., Stehlik I., Brochmann C., Conti E. Implications of ITS sequences and RAPD markers for the taxonomy and biogeography of the *Oxytropis campestris* and *O. arctica* (Fabaceae) complexes in Alaska. Am. J. Bot. 2003;90(10):1470-1480. DOI 10.3732/ajb.90.10.1470.
- Kholina A.B., Kozyrenko M.M., Artyukova E.V., Sandanov D.V., Andrianova E.A. Phylogenetic relationships of the species of *Oxytropis* DC. subg. *Oxytropis* and *Phacoxystropis* (Fabaceae) from Asian Russia inferred from the nucleotide sequence analysis of the intergenic spacers of the chloroplast genome. Russ. J. Genet. 2016;52(8):780-793. DOI 10.1134/S1022795416060065.
- Kholina A., Kozyrenko M., Artyukova E., Sandanov D., Selyutina I., Chimitov D. Plastid DNA variation of the endemic species *Oxytropis glandulosa* Turcz. (Fabaceae). Turkish J. Bot. 2017;42(1):38-50. DOI 10.3906/bot-1706-11.
- Leigh J.W., Bryant D. PopART full-feature software for haplotype network construction. Methods Ecol. Evol. 2015;6(9):1110-1116. DOI 10.1111/2041-210X.12410.
- Li X., Yang Y., Henry R.J., Rossetto M., Wang Y., Chen S. Plant DNA barcoding from gene to genome. Biol. Rev. 2015;90:157-166. DOI 10.1111/brv.12104.
- Librado P., Rozas J. DnaSP v5 a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics. 2009;25(11):1451-1452.
- Lu P., Gao L., Jin F., Enhebayaer E. Molecular phylogeny of 10 species of *Oxytropis* based on psbA-trnH sequences. Acta Bot. Yunnanica. 2014;3:279-284. DOI 10.1093/bioinformatics/btp187. DOI 10.7677/ynzwjy201413135.
- Malyshev L. Diversity of the genus *Oxytropis* in Asian Russia. Turczaninowia. 2008a;11(4):5-141.
- Malyshev L.I. Phenetics of the subgenera and sections in the genus *Oxytropis* DC. (Fabaceae) bearing on ecology and phylogeny. Contemp. Probl. Ecol. 2008b;1(4):440-444. DOI 10.1134/S1995425508040073.
- National Center for Biotechnology Information. U.S. National Library of Medicine, Rockville Pike, 1988. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Accessed 2 August 2017.
- Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method. A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 1987;4:406-425.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6 Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Mol. Biol. Evol. 2013;30(12):2725-2729. DOI 10.1093/molbev/mst197.
- Techen N., Parveen I., Pan Z., Khan I. DNA barcoding of medicinal plant material for identification. Curr. Opin. Biotechnol. 2014;25:103-110. DOI 10.1016/j.copbio.2013.09.010.
- Tekpinar A., Erkul S.K., Aytac Z., Kaya Z. Phylogenetic relationships among native *Oxytropis* species in Turkey using the *trnL* intron, *trnL*-F IGS, and *trnV* intron cpDNA regions. Turkish J. Bot. 2016;40(5):472-479. DOI 10.3906/bot-1506-45.
- The Red Book of the Republic of Kazakhstan. Almaty: ArtPrint XXI, 2014.
- Turuspekov Y., Abugalieva S. Plant DNA barcoding project in Kazakhstan. Genome. 2015;58(5):290.
- Turuspekov Y., Abugalieva S., Ermekbayev K., Sato K. Genetic characterization of wild barley populations (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) from Kazakhstan based on genome wide SNP analysis. Breed. Sci. 2014;64(4):399-403. DOI 10.1270/jsbbs.64.399.
- Turuspekov Y., Adams R.P., Kearney C.M. Genetic diversity in three perennial grasses from the Semipalatinsk nuclear testing region of Kazakhstan after long-term radiation exposure. Biochem. Syst. Ecol. 2002;30(9):809-817. DOI 10.1016/S0305-1978(02)00021-2.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. 1990;18(1):315-322.