

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)

И.Н. Леонова – д-р биол. наук (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. Rogozin – 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. Афтанас – 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. Пишный – 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)

Scientific Peer Reviewed Journal

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

I.N. Leonova, 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. Bespalova, 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. Khusnutdinova, 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

399

ОТ РЕДАКТОРА

Физиологическая генетика

400

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Сперматогенная функция семенников у крыс с наследственной предрасположенностью к проявлению кататонических реакций

М.А. Клещев, Т.А. Алехина, Л.В. Осадчук

406

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Гендер-специфическое влияние мутации *A^y* у мышей на метаболический фенотип потомства, рост плодов и экспрессию генов в плацентах

Е.Н. Макарова, Е.И. Денисова, В.В. Кожевникова, А.Е. Кулешова

Молекулярная и клеточная биология

415

ОБЗОР

Взаимосвязь прионов с некодирующими РНК

Р.Н. Мустафин, Э.К. Хуснутдинова

425

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Особенности протекания РНК-интерференции матричной металлопротеиназы 1 в эпидермальных кератиноцитах, обработанных интерлейкином 17А

Ю.А. Мозулевцева, А.В. Мезенцев, С.А. Брускин

433

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Исследование влияния гипотермической консервации на уровень натрия в клетках эндотелия трансплантата роговицы

Г.С. Батурина, И.Г. Пальчикова, А.А. Конев, Е.С. Смирнов, Л.Е. Каткова, Е.И. Соленов, И.А. Исаков

438

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Характеристики полисайтов связывания мРНК с мРНК гена *ZFNХ3* и его ортологов

А.М. Кондыбаева, А.Т. Акимниязова, С.У. Каменова, А.Т. Иващенко

Медицинская генетика

445

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Ассоциация полиморфизма генов 2'-5'-олигоаденилатсинтетаз с уровнем гуморального иммунного ответа после вакцинации против клещевого энцефалита

Н.С. Юдин, А.В. Игошин, С.Л. Лутова, Я. Гон, М.И. Воевода, В.А. Белявская

452

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Межлинейные различия по эмоциональным и весовым параметрам у крыс с кататоническим типом реагирования и крыс Вистар

Т.А. Алехина, Р.В. Кожемякина

459

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Анализ доменной специфичности протективного химерного антитела ch14D5a против гликопротеина Е вируса клещевого энцефалита

И.К. Байков, Л.А. Емельянова, Л.М. Соколова, Е.М. Карелина, А.Л. Матвеев, И.В. Бабкин, Я.А. Хлусевич, В.Ф. Подгорный, Н.В. Тикунова

Генофонд и селекция растений

468

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Фенетический анализ *Populus nigra*, *P. laurifolia* и *P. ×jrtyschensis* в зоне гибридизации

А.В. Климов, Б.В. Прошкин

476

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Использование межвидовой гибридизации в селекции адаптивных гибридов и сортов хризантемы садовой (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.)

А.И. Недолужко

484

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Мониторинг генетического разнообразия местных популяций рода *Aegilops* L. флоры Казахстана

Р. Уразалиев, М. Есимбекова, К. Мукин, А. Чиркин, Г. Исмагулова

399

FROM THE EDITOR

Physiological genetics

400

ORIGINAL ARTICLE

Sperm quality in rats predisposed to the manifestation of catatonic reactions

M.A. Kleshchev, T.A. Alekhina, L.V. Osadchuk

406

ORIGINAL ARTICLE

Gender-specific influence of A^y mutation on progeny metabolic phenotype, fetal growth and placental gene expression in mice

E.N. Makarova, E.I. Denisova, V.V. Kozhevnikova, A.E. Kuleshova

Molecular and cell biology

415

REVIEW

Interrelation of prions with non-coding RNAs

R.N. Mustafin, E.K. Khusnutdinova

425

ORIGINAL ARTICLE

RNAi-mediated silencing of matrix metalloproteinase 1 in epidermal keratinocytes influences the biological effects of interleukin 17A

J.A. Mogulevtseva, A.V. Mezentsev, S.A. Bruskin

433

ORIGINAL ARTICLE

Study of the effect of hypothermic conservation on the intracellular sodium concentration in the endothelium of corneal transplants

G.S. Baturina, I.G. Palchikova, A.A. Konev, E.S. Smirnov, L.E. Katkova, E.I. Solenov, I.A. Isakov

438

ORIGINAL ARTICLE

The characteristics of miRNA binding sites in mRNA of *ZFHX3* gene and its orthologs

A.M. Kondybayeva, A.N. Akimniyazova, S.U. Kamenova, A.T. Ivashchenko

Medical genetics

445

ORIGINAL ARTICLE

Association between polymorphisms in genes encoding 2'-5'-oligoadenylate synthetases and the humoral immune response upon vaccination against tick-borne encephalitis

N.S. Yudin, A.V. Igoshin, S.L. Lutova, Ya. Gon, M.I. Voevoda, V.A. Belyavskaya

452

ORIGINAL ARTICLE

Interstrain differences in emotional and weight indices in GC rats with catatonic response and Wistar rats

T.A. Alekhina, R.V. Kozhemjagina

459

ORIGINAL ARTICLE

Analysis of domain specificity of the protective chimeric antibody ch14D5a against glycoprotein E of tick-borne encephalitis virus

I.K. Baykov, L.A. Emelyanova, L.M. Sokolova, E.M. Karelina, A.L. Matveev, I.V. Babkin, Ya.A. Khlusevich, V.F. Podgornyy, N.V. Tikunova

Plant gene pool and breeding

468

ORIGINAL ARTICLE

Phenetic analysis of *Populus nigra*, *P. laurifolia* and *P. × jrtyschensis* in the hybridization zone

A.V. Klimov, B.V. Proshkin

476

ORIGINAL ARTICLE

Use of interspecific hybridization in the breeding of adaptive hybrids and sorts of garden chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.)

A.I. Nedoluzhko

484

ORIGINAL ARTICLE

Monitoring of *Aegilops* L. local species genetic diversity of Kazakhstan's flora

R. Urazaliev, M. Yessimbekova, K. Mukin, A. Chirkin, G. Ismagulova

Уважаемые читатели! Предлагаем вашему вниманию четвертый выпуск «Вавиловского журнала генетики и селекции», который включает результаты исследований в области физиологической и медицинской генетики, молекулярной и клеточной биологии, а также генетических ресурсов растений.

Первая статья раздела «Физиологическая генетика» посвящена вопросам наследственной предрасположенности к кататонии – психопатологическому синдрому, для которого характерны расстройства двигательных функций. На модели крыс с генетической кататонией были выявлены ассоциации кататонических реакций со снижением репродуктивных параметров и уменьшением фертильности взрослых самцов. Неизменный интерес вызывают работы по проблеме ожирения. Молекулярные механизмы, опосредующие влияние материнского ожирения на метаболический фенотип потомства, описаны во второй статье раздела.

Раздел «Молекулярная и клеточная биология» открывает обзор, посвященный прионам, их патологическим и инфекционным свойствам и роли микроРНК в патогенезе прионных болезней. Участие РНК в регуляции экспрессии генов, ответственных за патологические процессы в организме человека, рассматривается в двух других статьях раздела. В одной из них с использованием в качестве экспериментальной модели эпидермальных кератиноцитов человека исследован уровень экспрессии матричных металлопротеиназ. Установлено, что РНК-интерференция металлопротеиназ обладает потенциальным терапевтическим эффектом, который может быть использован при лечении псориаза. В другой статье показаны механизмы регуляции с помощью микроРНК гена-кандидата *ZFHX3*, участвующего в процессах развития инсульта, атеросклероза и других сердечно-сосудистых заболеваний.

В разделе «Медицинская генетика» обсуждаются актуальные проблемы про-

филактики и лечения клещевого энцефалита – вирусного заболевания, приводящего к неврологическим и психиатрическим осложнениям. На примере группы добровольцев, ранее не проходивших вакцинацию против клещевого энцефалита, коллективом исследователей из Новосибирска был проанализирован полиморфизм регуляторных областей генов, формирующих иммунный ответ. Еще одна статья посвящена разработке препаратов нового поколения на основе химерных антител для эффективной профилактики и терапии вируса клещевого энцефалита.

Известно, что при моделировании заболеваний значительную роль играют генетические модели. В этом же разделе приведены результаты изучения линии крыс с генетической кататонией, прошедших длительный процесс селекции. «Кататоническая» структура поведения особей была подтверждена на основании наследственных реакции каталепсии в покое и при стрессе.

Традиционная рубрика «Генофонд и селекция растений» включает три публикации. Авторы двух первых статей рассматривают вопросы интрогрессивной гибридизации у тополя и хризантемы. Проведена оценка эндогенной, межпопуляционной и внутривидовой изменчивости по фенотипическим признакам в зоне естественной гибридизации тополей, распространенных в западносибирском регионе. У всех изученных видов уровень внутривидовой изменчивости оказался значительно выше межпопуляционного. Полученные результаты свидетельствуют также о резком снижении межпопуляционной изменчивости под влиянием естественного отбора на ранних стадиях онтогенеза. В работе по созданию нового селекционного материала хризантемы садовой с использованием природного генофонда рода *Chrysanthemum* предложена стратегия получения отечественных адаптивных гибридов и сортов хризантемы садовой с помощью межвидовой гибридизации. Рубрику завершает статья, которая знакомит с генетическим разнообразием местных экотипов рода *Aegilops*, распространенных на территории Казахстана. Проведен скрининг казахстанских местных популяций и идентифицированы образцы, которые могут быть использованы в качестве источников скороспелости и устойчивости к болезням.

В 2018 году Вавиловский журнал генетики и селекции/Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii был включен в четвертую базу WoS Core Collection – Emerging Sources Citation Index (ESCI). Импакт-фактор для статей, включенных в базу ESCI, не рассчитывается. Нахождение журнала в международных базах данных повышает его видимость и цитируемость. Таким образом, при условии хорошей цитируемости журнал становится кандидатом для отбора в первую базу данных WoS Core Collection – Science Citation Index Expanded.

Академик В.К. Шумный

Сперматогенная функция семенников у крыс с наследственной предрасположенностью к проявлению кататонических реакций

М.А. Клещев , Т.А. Алехина, Л.В. Осадчук

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

Кататония – психопатологический синдром, проявляющийся как двигательные расстройства. Кататонический синдром сопутствует многим психическим заболеваниям, в частности шизофрении и депрессии, которые широко распространены в популяции человека. Линия крыс ГК (генетическая кататония) получена из линии Вистар путем длительной (78 поколений) селекции на кататонический тип реагирования и служит моделью шизофренических и депрессивных состояний у человека. Известно, что селекция по поведению, в том числе по выраженности кататонической реакции, приводит к нейроэндокринным, репродуктивным и морфологическим изменениям у животных. Однако влияние отбора по выраженности кататонической реакции на сперматогенную функцию семенников у самцов крыс не изучалось. Целью настоящей работы было провести сравнительное исследование сперматогенной функции семенников у крыс линии ГК и линии Вистар в период полового созревания (50-й день жизни) и у взрослых животных (90-й день жизни). Определяли количество эпидидимальных сперматозоидов, долю половых клеток с прогрессивным движением, долю морфологически аномальных сперматозоидов, а также массу репродуктивных органов и размер помета. У взрослых крыс линии ГК количество сперматозоидов и их подвижность, масса тела, семенников и каудальных эпидидимисов, количество рожденных потомков были снижены по сравнению с крысами линии Вистар. В период полового созревания крысы линии ГК характеризовались большим количеством сперматозоидов по сравнению с линией Вистар. Межлинейных различий по доле морфологических аномалий сперматозоидов у самцов крыс не отмечено. Предполагается, что изменения сперматогенных показателей при селекции крыс на выраженность кататонической реакции обусловлены нарушением онтогенетического паттерна секреции тестостерона. Таким образом, наследственная предрасположенность к проявлению кататонических реакций может быть ассоциирована с ухудшением сперматогенных параметров половозрелых самцов крыс. Линия крыс ГК может являться перспективной моделью для исследования взаимосвязи между наследственной предрасположенностью к кататонии и сперматогенезом.

Ключевые слова: кататония; селекционная модель; крысы; количество сперматозоидов; подвижность сперматозоидов; морфология сперматозоидов; фертильность; световая микроскопия; половое созревание.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Клещев М.А., Алехина Т.А., Осадчук Л.В. Сперматогенная функция семенников у крыс с наследственной предрасположенностью к проявлению кататонических реакций. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(4):400-405. DOI 10.18699/VJ18.375

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Kleshchev M.A., Alekhina T.A., Osadchuk L.V. Sperm quality in rats predisposed to the manifestation of catatonic reactions. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(4):400-405. DOI 10.18699/VJ18.375 (in Russian)

Sperm quality in rats predisposed to the manifestation of catatonic reactions

M.A. Kleshchev , T.A. Alekhina, L.V. Osadchuk

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Catatonia is a psychopathological syndrome displayed as a motor disorder. Catatonia is a sign of many mental disorders, particularly schizophrenia and depression, with a wide distribution in the human population. The GC ("genetic" and "catatonia") rat strain was obtained from the Wistar rat strain by a long selection (78 generations) for the catatonic type of reaction and is a model of schizophrenic and depressive disorders in humans. It is known that selection for behavior including catatonic reactions results in neuroendocrine, reproductive and morphological changes in animals. However, the influence of selection for a catatonic reaction on the spermatogenic function of testes had not been studied. The aim of this study was to conduct a comparative investigation of sperm quality in rats of the GC and the Wistar strain. The epididymal sperm parameters (sperm count, sperm motility, sperm morphology) were measured, and body, testes and epididymal weight were determined at puberty (50 day of life) and at adulthood (90 day of life). The litter size of the GC and Wistar rats was determined. It was found that adult GC rats had a lower sperm count, sperm motility, testis weight, epididymal weight and litter size compared to adult Wistar rats. However, at puberty, GC rats had a higher sperm count than the Wistar strain. Interstrain differences in sperm morphology were not found. It has been assumed that the changes of spermatogenic parameters in response to selection for catatonia are caused by changing the ontogenic pattern of testosterone secretion. In conclusion, the hereditary predisposition to catatonic reaction is associated with impaired sperm parameters in adult rats that reduces their chance to reproduction. The GC rat strain can be a perspective model for investigation of the relationship between the hereditary predisposition to catatonia and spermatogenesis.

Key words: catatonia; selection model; sperm count; sperm motility; sperm morphology; fertility; light microscopy; puberty; rat.

Кататония – распространенный психопатологический синдром, к основным проявлениям которого относятся двигательные расстройства: ступор, каталепсия, стереотипия и некоторые другие (Wilcox, Duffy, 2015). На сегодняшний день считается, что кататонические реакции характерны для аффективных расстройств, шизофренических психозов и посттравматических состояний (Daniels, 2009). В начале 1980-х гг. из популяции крыс аутбредной линии Вистар была селекционирована линия крыс ГК (генетическая кататония). Селекция велась на частоту, выраженность и длительность каталептического застывания, которое вызывали, прижимая крысу с помощью палочки спиной к углу клетки. В дальнейшем линия крыс ГК стала моделью шизофренических (Kolpakov et al., 1986), депрессивных (Kulikov et al., 2006) и невротических симптомов (Рязанова и др., 2012), наблюдаемых у человека.

Известно, что после длительной селекции по поведению наследуется отбираемый признак и коррелятивно изменяются неспецифические функции – стрессорная и половая (Беляев, 1962). На основании многочисленных экспериментальных данных, полученных при доместикации животных, Д.К. Беляевым была выдвинута концепция дестабилизирующего отбора, согласно которой селекция на поведенческие признаки сопряжена с изменением нейрогормональных систем, регулирующих онтогенез особи (Беляев, 1981). В ряде исследований установлено, что при селекции крыс на выраженность кататонической реакции, так же как и при доместикации животных, происходила дестабилизация регуляторных систем онтогенеза, которая выражалась в появлении новых морфологических признаков и изменении нейроэндокринных систем, контролирующих в том числе репродуктивную функцию (Алехина и др., 2016). У крыс отмечалось снижение содержания в гипоталамусе важнейших нейротрансмиттеров – дофамина, норадреналина и серотонина (Алехина и др., 2006). Кроме того, установлено более низкое содержание тестостерона в плазме крови у взрослых крыс кататонической линии в 20-м и 50-м поколениях селекции по сравнению с первым поколением и материнской линией Вистар (Шульга и др., 1996). У самок крыс линии ГК было обнаружено уменьшение общего числа фолликулов в проэструсе и диэструсе в 3-месячном возрасте, более низкая частота эструсов и диэструсов в возрасте 6–12 месяцев, а также повышенный уровень синхронизации эстральной цикличности при групповом содержании по сравнению с крысами исходной линии Вистар (Алехина и др., 2015).

Вызванные отбором на выраженность кататонической реакции изменения в гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси могут оказывать влияние и на сперматогенную функцию семенников самцов крыс. Особенно важен для онтогенетического становления и регуляции как сперматогенеза, так и поведения тестостерон. Секреция тестостерона относительно высока в первые сутки после родов, но затем снижается и начинает вновь увеличиваться в начале полового созревания (Chen et al., 2015). Увеличение секреции тестостерона в перинатальный период и во время полового созревания оказывает программирующий эффект на развитие мозговых структур, контролирующих поведение (Trainor et al., 2009), а также необходимо для развития клеток Сертоли и становления сперматогенеза

(Hazra et al., 2013). Ранее было установлено смещение перинатального пика тестостерона у крыс линии ГК на более поздние сроки онтогенеза по сравнению с крысами Вистар (Осадчук, Алехина, 2018). Это может оказать влияние на пролиферацию и дифференциацию клеток Сертоли и, следовательно, привести к изменениям в качестве и количестве сперматозоидов. Однако, несмотря на значительный объем полученных данных о морфологических, нейроэндокринных и репродуктивных изменениях у крыс линии ГК, влияние отбора по выраженности кататонической реакции на количество и качество сперматозоидов у самцов крыс не изучалось.

Исследование сперматогенной функции семенников у крыс линии ГК может помочь в понимании механизмов взаимосвязи наследственной предрасположенности к проявлению кататонических реакций и сперматогенеза. Изучение этих механизмов является актуальной проблемой, поскольку количество и качество сперматозоидов во многом определяют шансы самцов на воспроизводство потомства. Поэтому возможное ухудшение сперматогенных параметров у самцов, генетически предрасположенных к развитию патологических поведенческих реакций, в частности кататонии, может быть важным механизмом, устраняющим таких самцов из размножения в естественной популяции животных, и таким образом вносить вклад в стабилизирующий отбор по поведению. Кроме того, данные исследования имеют прикладное значение, поскольку шизофрения и депрессия, моделью которых служит линия крыс ГК, широко распространены в человеческой популяции. В ряде исследований установлено снижение репродуктивного потенциала и ухудшение качества эякулята у мужчин, страдающих депрессией и шизофренией (Worly, Gur, 2015). Механизмы этого феномена на данный момент неизвестны, вероятно, они могут включать наследственный компонент.

Целью настоящего исследования было изучить влияние длительной селекции по выраженности кататонической реакции на сперматогенную функцию семенников у самцов крыс во взрослом возрасте и в период полового созревания, который является критическим для онтогенетического становления сперматогенеза. Для этого было проведено сравнительное исследование количества эпидидимальных сперматозоидов, подвижности и морфологии половых клеток у самцов крыс линии ГК (78-е поколение селекции) и исходной линии Вистар у половозрелых и пубертатных животных. Чтобы более полно охарактеризовать влияние нейроэндокринных изменений, вызванных селекцией по поведению на развитие половой системы самцов и фертильность животных, мы оценивали также массу тела, репродуктивных органов и размер помета у крыс линий ГК и Вистар.

Материал и методы

Животные. В работе использовали крыс инбредной линии ГК и исходной аутбредной линии Вистар. Животных содержали группами по 5–6 особей в условиях конвенционального вивария Института цитологии и генетики СО РАН в стандартных пластиковых клетках размером 60×40×20 см с крышкой из металлических прутьев, при естественном фотопериоде. Вода и пища (гранули-

рованный полнорационный апатогенный корм «Чара», Россия) предоставлялись животным без ограничения. При рождении потомства записывали количество рожденных крысят в каждом помете. Забой животных производился в феврале. Для снятия эффектов группового содержания за четверо суток до забоя крыс рассаживали в индивидуальные клетки, аналогичные тем, в которых их содержали ранее.

Принято считать, что у крыс половое созревание начинается с 30–35 дня жизни, а заканчивается в возрасте 55–60 дней, когда появляется способность к фертильным спариваниям (Ojeda, Urbanski, 1994). Исследование проводили на крысах в возрасте 50 дней (период полового созревания) и 90 дней (взрослые животные). В обеих возрастных точках исследовали по 10 крыс каждой линии. Все экспериментальные процедуры выполнены с соблюдением правил, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/669/ЕЕС) и Хельсинкской декларации по защите позвоночных животных, используемых для лабораторных целей.

Исследование эпидидимальных сперматозоидов. Крыс предварительно обрабатывали диэтиловым эфиром в течение 5 мин, взвешивали, а затем декапитировали. Немедленно после забоя выделяли и взвешивали семенники и каудальные эпидидимисы. У крыс в возрасте 50 дней оба каудальных эпидидимиса помещали в 1 мл фосфатного буфера для дальнейшей оценки количества эпидидимальных сперматозоидов и их морфологии. Из-за очень низкого числа эпидидимальных сперматозоидов и, соответственно, низкой их концентрации в суспензии у крыс в возрасте 50 дней подвижность сперматозоидов не оценивали. У взрослых крыс один эпидидимис помещали в 3 мл фосфатного буфера для оценки количества и морфологии сперматозоидов, а второй – в 1 мл культуральной среды DMEM (Gibco, США) для последующей оценки доли подвижных сперматозоидов. Эпидидимисы выбирались случайным образом. Эпидидимальную ткань измельчали ножницами, встряхивали на шейкере в течение 10 мин и фильтровали через пластиковые фильтры Falcon (диаметр сетки 70 мкм). Используя анализатор фертильности спермы SFA-500 (НПФ «Биола», Россия), оценивали долю сперматозоидов с прогрессивным движением. Измерения проводили при постоянной температуре культуральной среды (37 °C). Количество сперматозоидов подсчитывали в камере Горяева под световым микроскопом при увеличении $\times 200$, после окраски 1 % водным раствором эозина. Результаты пересчитывали на оба каудальных эпидидимиса. Для подсчета морфологически аномальных сперматозоидов аликвоту суспензии сперматозоидов помещали на предметное стекло и делали мазок. Мазки фиксировали метанолом в течение 1 мин и окрашивали с помощью набора красителей Diff-Quick («Абрис+», Россия). Количество аномальных сперматозоидов подсчитывали под световым микроскопом при увеличении $\times 400$. Сперматозоид считали морфологически аномальным, если хотя бы одна из его частей (головка, средняя часть или хвост) имела видимые в световой микроскоп нарушения строения, такие как аморфная головка, аномалии строения крючка, закрученный или шпилькообразный хвост и некоторые другие (Seed et al., 1996).

Статистический анализ данных выполняли с использованием пакета компьютерных программ Statistica 6.0. Для данных, имеющих нормальное распределение (вес тела и семенников, доля подвижных сперматозоидов), проводили двухфакторный и однофакторный дисперсионный анализ (главные факторы – генотип и возраст). Для сравнения групп в рамках дисперсионного анализа использовали тест Дункана. Для данных, имеющих распределение, отличающееся от нормального (вес эпидидимисов, количество эпидидимальных сперматозоидов и доля аномальных сперматозоидов), группы сравнивали с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Данные представлены в статье как средняя выборочная и ее ошибка. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Результаты

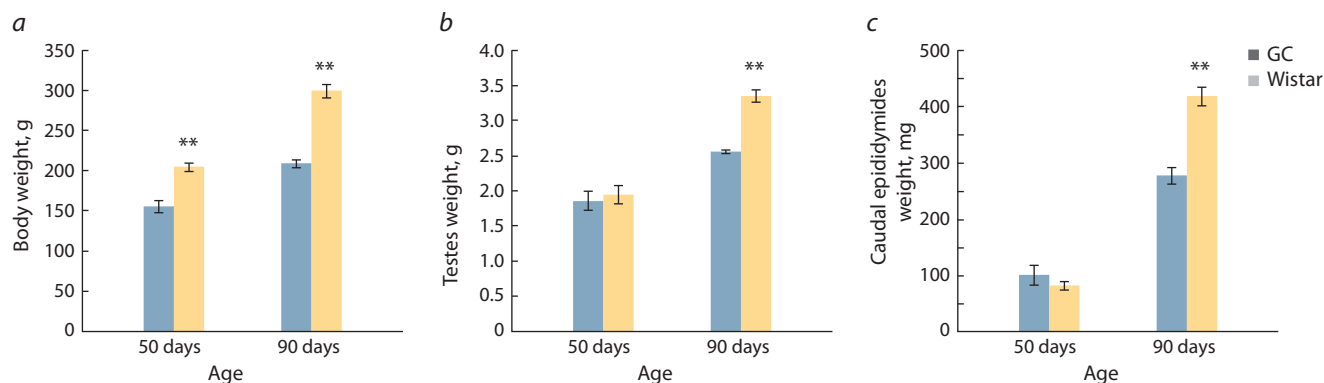
За период исследования отслежен 81 случай рождения крысят обеих линий. В расчете на один помет родилось больше особей в популяции Вистар, чем в линии ГК ($10.2 \pm 0.3, n = 43$; $8.6 \pm 0.3, n = 38$; $p < 0.05$ соответственно).

Двухфакторный дисперсионный анализ позволил установить достоверное влияние возраста ($F_{1,36} = 115.77, p < 0.01$) и генотипа ($F_{1,36} = 106.49, p < 0.01$) на массу тела самцов крыс (рисунок, а). Кроме того, наблюдалось достоверное взаимодействие факторов ($F_{1,36} = 9.50, p < 0.05$). Масса тела крыс линии ГК была достоверно меньше, чем у крыс линии Вистар, как в начале полового созревания, так и в возрасте 90 дней ($p < 0.01$, тест Дункана). Масса тела самцов крыс обеих линий достоверно увеличивалась с возрастом ($p < 0.01$, тест Дункана), но крысы линии Вистар быстрее набирали массу по сравнению с крысами линии ГК.

Двухфакторный дисперсионный анализ выявил достоверное влияние возраста ($F_{1,36} = 84.07, p < 0.01$) и генотипа ($F_{1,36} = 15.49, p < 0.01$) на массу семенников крыс (см. рисунок, б). Установлено также достоверное взаимодействие факторов генотипа и возраста ($F_{1,36} = 9.38, p < 0.05$). Масса семенников достоверно увеличивалась с возрастом как у крыс линии Вистар ($p < 0.01$, тест Дункана), так и у крыс линии ГК ($p < 0.01$, тест Дункана). В возрасте 90 дней масса семенников крыс линии Вистар была достоверно выше, чем крыс линии ГК того же возраста ($p < 0.01$, тест Дункана). В период полового созревания (50-й день жизни) межлинейных различий по массе семенников не наблюдалось.

Масса каудальных эпидидимисов (см. рисунок, в) крыс обеих линий достоверно увеличивалась с возрастом ($p < 0.01$, тест Манна–Уитни). В возрасте 90 дней масса каудальных эпидидимисов у крыс линии Вистар достоверно превышала этот показатель у крыс линии ГК ($p < 0.01$, тест Манна–Уитни). На 50-й день жизни межлинейных различий по массе каудальных эпидидимисов не отмечено.

На 50-й день жизни сперматозоиды в каудальных эпидидимисах отмечались у всех крыс. Число сперматозоидов достоверно увеличивалось с возрастом ($p < 0.01$, тест Манна–Уитни) у крыс обеих линий (см. таблицу). В период полового созревания число эпидидимальных сперматозоидов у крыс линии ГК достоверно превышало



Weights of (a) body, (b) testes, and (c) caudal epididymides in GC and Wistar rats at the ages of 50 and 90 days.

** Interlinear differences significant at $p < 0.01$.

Populations of epididymal spermatozoa and percentages of abnormal spermatozoa in GC and Wistar male rats with age

Parameter	Day 50 of life		Day 90 of life	
	GC	Wistar	GC	Wistar
Number of spermatozoa in both caudal epididymides $\times 10^6$	5.14 $\pm$ 2.25	0.04 $\pm$ 0.01**	71.46 $\pm$ 5.14	110.73 $\pm$ 4.34**
Percentage of abnormal spermatozoa	57.35 $\pm$ 12.39	77.85 $\pm$ 7.48	3.87 $\pm$ 0.45	4.11 $\pm$ 0.62

** Interlinear differences between males of the same age significant at $p < 0.01$.

этот показатель у крыс линии Вистар ($p < 0.01$, тест Манна–Уитни). На 90-й день жизни число сперматозоидов у крыс линии ГК было достоверно ниже, чем у крыс линии Вистар ($p < 0.01$, тест Манна–Уитни).

Доля аномальных сперматозоидов (см. таблицу) у самцов крыс обеих линий достоверно снижалась с возрастом ($p < 0.01$, тест Манна–Уитни). Достоверных межлинейных различий по данному показателю не установлено как в период полового созревания, так и у взрослых животных.

Однофакторный дисперсионный анализ позволил установить влияние генотипа на долю подвижных сперматозоидов у взрослых самцов крыс ($F_{1,18} = 4.52$, $p < 0.05$). Доля прогрессивно подвижных сперматозоидов у крыс линии Вистар (58.07 ± 8.09 %) была достоверно ($p < 0.05$, тест Дункана) выше, чем у крыс линии ГК (37.36 ± 5.41 %).

Обсуждение

В результате проведенного исследования установлено, что взрослые самцы линии ГК обладают по сравнению с самцами исходной линии Вистар сниженной массой тела, семенников и каудальных эпидидимисов, более низким количеством сперматозоидов и уменьшенной долей подвижных сперматозоидов. Кроме того, у крыс линии ГК отмечалось уменьшение размера помета по сравнению с крысами исходной линии Вистар. Таким образом, длительный (в течение 78 поколений) отбор крыс на проявление кататонической реакции привел к координированному снижению целого комплекса репродуктивных параметров у взрослых самцов и уменьшению фертильности крыс. В некоторых работах отмечается, что у людей, страдающих психическими отклонениями, в частности шизофре-

нией и депрессией, ослаблены сперматогенная (Worly, Gur, 2015) и гормональная (Markham, 2012) функции семенников, а также снижена демографическая фертильность (Terzian et al., 2006). Эти эффекты авторы связывают с негативным влиянием социальной среды или воздействием препаратов, используемых для коррекции поведения. Результаты нашего исследования на модели ГК показывают, что генетическая предрасположенность к кататоническим реакциям сама по себе может быть ассоциирована со снижением количества и подвижности сперматозоидов, а также уменьшением плодовитости, однако механизмы данной ассоциации в настоящее время не ясны.

Нами установлено, что сниженное количество эпидидимальных сперматозоидов у взрослых самцов крыс линии ГК ассоциировано с более низкой массой семенников. Масса семенников и продукция сперматозоидов у взрослых животных во многом определяются числом клеток Сертоли – соматических клеток семенника, каждая из которых способна обеспечить развитие строго определенного числа половых клеток (Sharpe et al., 2003). Поэтому можно предположить, что сниженное количество сперматозоидов у взрослых самцов линии ГК связано с меньшим количеством клеток Сертоли у самцов этой линии по сравнению с самцами линии Вистар.

У крыс дефинитивная (взрослая) популяция клеток Сертоли формируется до 15-дневного возраста (Sharpe et al., 2003). Затем клетки Сертоли теряют пролиферативную активность, дифференцируются и начинают формировать гематотестикулярный барьер, необходимый для поддержания сперматогенеза. Пролиферация, созревание клеток Сертоли и инициация сперматогенеза находятся под конт-

ролем ряда цитокинов, ростовых факторов и гормонов, в частности тестостерона (Escott et al., 2014).

В норме уровень тестостерона у самцов крыс относительно высокий сразу после рождения животного, но резко уменьшается в течение первых суток (Chen et al., 2015), а затем снова увеличивается уже в период полового созревания. С другой стороны, экспрессия генов андрогенового рецептора (AR) на клетках Сертоли начинается только с 5-го дня жизни и достигает дефинитивного уровня на 21-й день (You, Sar, 1998). Предполагают, что временная разобщенность перинатального пика тестостерона и экспрессии AR важна для защиты клеток Сертоли от преждевременного созревания и остановки пролиферации, которая интенсивно идет в первые несколько суток после родов. Это связано с тем, что тестостерон тормозит пролиферацию клеток Сертоли, стимулирует их дифференцировку, формирование битестикулярного барьера и начало сперматогенеза (Escott et al., 2014). Мутантные мыши TgSCAR, для которых характерна преждевременная обильная экспрессия андрогенового рецептора на клетках Сертоли, характеризуются более ранним началом сперматогенеза, но и меньшим размером семенников во взрослом возрасте по сравнению с мышами дикого типа (Hazra et al., 2013).

Учитывая эти данные, можно предположить, что смещение перинатального пика тестостерона на более поздние сроки (7–10-й день жизни), наблюдаемое у крыс линии ГК (Осадчук, Алехина, 2018), может приводить к воздействию тестостерона на андрогеновые рецепторы, которые к этому времени уже начинают экспрессироваться на клетках Сертоли. Это в свою очередь служит причиной более ранней остановки пролиферации клеток Сертоли, более раннего их созревания и обуславливает относительно раннее начало сперматогенеза у крыс линии ГК по сравнению с крысами исходной линии Вистар. Об этом может свидетельствовать большее количество эпидидимальных сперматозоидов у крыс линии ГК по сравнению с крысами линии Вистар в период полового созревания. Однако число клеток Сертоли у крыс линии ГК меньше, чем у крыс линии Вистар, вследствие преждевременной остановки их пролиферации, и, соответственно, количество сперматозоидов у взрослых крыс ГК также снижено. Безусловно, данное предположение нуждается в дальнейшей экспериментальной проверке.

Кроме того, уменьшение подвижности и количества сперматозоидов у крыс линии ГК может быть обусловлено относительно высоким уровнем кортикостерона в их крови (Алехина и др., 2016). Можно предположить, что повышенная реактивность нервной системы, характерная для крыс линии ГК на данном этапе селекции, обуславливает выраженную реакцию стресса на повседневные процедуры по уходу за животными в виварии, что вызывает повышение секреции кортикостерона. Постоянно высокая активность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси может подавлять тестикулярную функцию (Ren et al., 2010; Toufexis et al., 2014) и приводить к снижению количества и подвижности сперматозоидов у крыс линии ГК.

В нашем исследовании установлено, что доля аномальных сперматозоидов у крыс линии ГК не отличалась от таковой у крыс исходной линии Вистар в оба изученных

периода онтогенеза. Полученные результаты показывают, что селекция крыс на предрасположенность к кататоническим реакциям, вероятно, не затрагивает регуляторные системы, контролирующие молекулярные процессы, которые предопределяют формирование морфологически нормального сперматозоида. Содержание морфологически нормальных сперматозоидов в сперме является важнейшим показателем, определяющим ее оплодотворяющую способность (Cooper et al., 2010), так как только такие половые клетки способны к оплодотворению. Поэтому нормальное протекание процессов морфологической дифференцировки сперматид у самцов крыс линии ГК может вносить существенный вклад в сохранение способности к размножению самцов этой линии.

Таким образом, генетическая предрасположенность к проявлению кататонических реакций у крыс линии ГК ассоциирована с ухудшением сперматогенных параметров, причем данная взаимосвязь модулирована возрастом животных. Поэтому линия крыс ГК может служить перспективной моделью для исследования взаимосвязи между кататоническим поведением самца и становлением его тестикулярной функции в онтогенезе.

Acknowledgments

This work was supported by State Budgeted Project 0324-2018-0016 “Cellular and molecular mechanisms controlling adaptive and pathological processes in humans and animals” and the Russian Foundation for Basic Research, project 17-04-01631. The propagation of animal strains was performed at the Shared Access Center for Genetic Resources of Laboratory Animals, project RFMEFI62117X0015.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest..

References

- Alekhina T.A., Klochkov D.V., Pal'chikova N.A., Kuz'minova O.I., Prokudina O.I. Synchronization of the estrous cycle against the background of increased excitability in rats selected for catatonic type of reaction. *Byulleten Eksperimental'noy Biologii i Meditsiny* = Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2015;159(1):83-86. DOI 10.1007/s10517-015-2893-x. (in Russian)
- Alekhina T.A., Palchikova N.A., Kozhemyakina R.V., Prokudina O.I. Destabilization signs in behavioral and somatovegetative parameters of rats selected for catatonia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekt-sii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(1):28-33. DOI 10.18699/VJ16.103. (in Russian)
- Alekhina T.A., Petrova G.V., Barykina N.N., Prokudina O.I., Chugui V.F., Sakharov D.G., Kolpakov V.G. Some neuroendocrinological changes in rats of cataleptic strain GC. Influences of ontogenesis and generation of breeding. *Rossiyskiy Fiziologicheskii Zhurnal im. I.M. Sechenova* = I.M. Sechenov Physiological Journal. 2006;92(4):499-505. (in Russian)
- Belyaev D.K. Some problems of correlative variability and their significance for the theory of evolution and selection of animals. *Izvestiya SO AN SSSR* = Bulletin of the Siberian Branch of the USSR Academy of Sciences. 1962;10:111-124. (in Russian)
- Belyaev D.K. Destabilizing selection as a factor of domestication. In: *Genetics and Humanity Well-being*. Moscow: Nauka Publ., 1981;53-66. (in Russian)
- Chen L., Wang R., Wang W., Lu W., Xiao Y., Wang D., Dong Z. Hormone inhibition during mini-puberty and testicular function in male rats. *Int. J. Endocrinol. Metab.* 2015;13(4):2-6. DOI 10.5812/ijem.25465.

- Cooper T.G., Noonan E., Eckardstein S., Auger G., Baker H.W., Behre H.M., Haugen T.B., Löss E.S., Wang C., Mbizvo M.T., Vogelsson K.M. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum. Reprod. Update.* 2010;16(3):231-245. DOI 10.1093/humupd/dmp048.
- Daniels J. Catatonia: clinical aspects and neurobiological correlates. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 2009;21(4):371-380. DOI 10.1176/appi.neuropsych.21.4.371.
- Escott G.M., da Rosa L.A., Löss E.S. Mechanisms of hormonal regulation of Sertoli cell development and proliferation: a key process for spermatogenesis. *Curr. Mol. Pharmacol.* 2014;7(2):96-108.
- Hazra R., Corcoran L., Robson M., McTavish K.J., Upton D., Handelsman D.J., Allan C.M. Temporal role of Sertoli cell androgen receptor expression in spermatogenic development. *Mol. Endocrinol.* 2013;27(11):12-24. DOI 10.1210/me.2012-1219.
- Kolpakov V.G., Parvez S.H., Barykina N.N. A tentative evolutionary biological approach to the problem of schizophrenia. *Biogenic Amines.* 1986;3(4):299-319.
- Kulikov A.V., Kolpakov V.G., Popova N.K. The genetic cataleptic (GC) rat strain as a model of depressive disorders. In: Kalueff A.V. (Ed.). *Animal Models in Biological Psychiatry.* USA: Nova Sci. Publ., 2006;59-73.
- Markham J.A. Sex steroids and schizophrenia. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 2012;13(3):187-207. DOI 10.1007/s11154-011-9184-2.
- Ojeda S.R., Urbanski H.F. Puberty in the rat. In: Knobil E., Neill J.D. (Eds.). *The Physiology of Reproduction.* New York: Raven Press Ltd., 1994;363-409.
- Osadchuk L.V., Alekhina T.A. Developmental profiles of hormonal and metabolic parameters in male rats selected for catatonic type of response. *Zhurnal Evolyutsionnoy Biokhimii i Fiziologii = Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology.* 2018;54(1):52-59. (in Russian)
- Ren L., Li X., Weng Q., Trisomboon H., Yamamoto T., Pan L., Watanabe G., Taya K. Effects of acute restraint stress on sperm motility and secretion of pituitary, adrenocortical and gonadal hormones in adult male rats. *J. Vet. Med. Sci.* 2010;72(11):1501-1506.
- Ryazanova M.A., Igonina T.N., Alekhina T.A., Prokudina O.I. The increase in the proportion of nervous animals bred for catatonia: the participation of central adrenoreceptors in catatonic reactions. *Russ. J. Genetics (Moscow).* 2012;48(11):1141-1147.
- Seed J., Chapin R.E., Clegg E.D., Dostal L.A., Foote R.H., Hurtt M.E., Klinefelter G.R., Makris S.L., Perreault S.D., Schrader S., Seyler D., Sprando R., Treinen K.A., Veeramachaneni D.N., Wise L.D. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. *Reprod. Toxicol.* 1996;10(3):237-244.
- Sharpe R.M., McKinnell C., Kivlin C., Fisher J.S. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction.* 2003;125(6):769-784.
- Shul'ga V.A., Barykina N.N., Alekhina T.A., Kolpakov V.G. Some physiological characteristics of genetic predisposition to catalepsy. *Rossiyskiy Fiziologicheskiy Zhurnal im. I.M. Sechenova = I.M. Sechenov Physiological Journal.* 1996;82(10-11):77-83. (in Russian)
- Terzian A.C., Andreoli S.B., Razzouk D., Chaves A.C., Mari J.J. Fertility and fecundity of an outpatient sample with schizophrenia. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 2006;28(4):305-307.
- Toufexis D., Rivarola M.A., Lara H., Viau V. Stress and the reproductive axis. *J. Neuroendocrinol.* 2014;26(9):573-586. DOI 10.1111/jne.12179.
- Trainor B.C., Sisk C.L., Nelson R.J. Hormones and the development and expression of aggressive behavior. In: Pfaff D.W., Arnold A.P., Etgen A.M., Fahrback S.E., Rubin R.T. (Eds.). *Hormones, Brain and Behavior.* 2nd ed. San Diego: Acad. Press, 2009;1:167-203. DOI 10.1016/B978-008088783-8.00005-X.
- Wilcox A., Duffy R. The syndrome of catatonia. *Behav. Sci.* 2015;5(4):576-578. DOI 10.3390/bs5040576.
- Worly B.L., Gur T.L. The effect of mental illness and psychotropic medication on gametes and fertility: a systematic review. *J. Clin. Psychiatry.* 2015;76(7):974-985. DOI 10.4088/JCP.14r09080.
- You L., Sar M. Androgen receptor expression in the testes and epididymides of prenatal and postnatal Sprague-Dawley rats. *Endocrine.* 1998;9(3):253-261.

Гендер-специфическое влияние мутации A^y у мышей на метаболический фенотип потомства, рост плодов и экспрессию генов в плацентах

Е.Н. Макарова , Е.И. Денисова, В.В. Кожевникова, А.Е. Кулешова

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

Ожирение матерей в период беременности повышает риск возникновения ожирения у потомства. Для разработки методов коррекции развития потомства у матерей, страдающих метаболическими расстройствами, необходимо изучение молекулярных механизмов, опосредующих влияние материнской среды на онтогенез потомства. Уровень лептина повышается при ожирении. У мышей линии C57Bl мутация A^y вызывает повышение уровня лептина в крови самок во время беременности и оказывает гендер-специфическое влияние на метаболический фенотип потомства в зрелости. Целью работы было изучить влияние мутации A^y на склонность к развитию диетарного ожирения у мужского и женского потомства, на массу плодов и плацент и экспрессию генов в плацентах плодов разного пола. Оценивали массу тела и потребление пищи у мужского и женского потомства A^y/a и a/a (контроль) самок при содержании на стандартной диете и диете, индуцирующей ожирение, массу плодов и плацент на 13-й и 18-й дни беременности и экспрессию генов транспортеров глюкозы (GLUT1, GLUT3), нейтральных аминокислот (SNAT1, SNAT2, SNAT4), инсулиноподобного фактора роста 2 IGF2 и его рецептора IGF2R в плацентах плодов мужского и женского пола. Мутация A^y влияла на массу тела только у мужского потомства при содержании на стандартной диете и не оказывала влияния на развитие ожирения у потомства обоего пола. Масса плодов и плацент у A^y/a по сравнению с a/a самками была снижена на 13-й день беременности и не различалась на 18-й день. На 13-й день беременности уровень мРНК исследованных генов в плацентах мужских и женских плодов не различался у a/a самок. У A^y/a самок экспрессия генов, кодирующих GLUT1, GLUT3, SNAT1 и SNAT4, была снижена в плацентах плодов женского пола по сравнению с плацентами плодов мужского пола. Полученные результаты позволяют предполагать, что зависящий от пола плодов транскрипционный ответ плацент на повышенный уровень лептина у беременных A^y/a самок может опосредовать гендер-специфическое влияние мутации A^y на метаболизм потомства в постнатальной жизни.

Ключевые слова: мутация A^y ; лептин; плацента; плод; мыши; экспрессия генов.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Макарова Е.Н., Денисова Е.И., Кожевникова В.В., Кулешова А.Е. Гендер-специфическое влияние мутации A^y у мышей на метаболический фенотип потомства, рост плодов и экспрессию генов в плацентах. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(4):406-414. DOI 10.18699/VJ18.376

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Makarova E.N., Denisova E.I., Kozhevnikova V.V., Kuleshova A.E. Gender-specific influence of A^y mutation on progeny metabolic phenotype, fetal growth and placental gene expression in mice. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(4):406-414. DOI 10.18699/VJ18.376 (in Russian)

Gender-specific influence of A^y mutation on progeny metabolic phenotype, fetal growth and placental gene expression in mice

E.N. Makarova , E.I. Denisova, V.V. Kozhevnikova, A.E. Kuleshova

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Obesity during pregnancy increases the risk of obesity in offspring. To correct the offspring development in obese mothers, it is necessary to reveal the molecular mechanisms that mediate the influence of the maternal environment on the offspring ontogenesis. Leptin levels increase with obesity. In C57Bl mice, the A^y mutation is associated with elevated blood levels of leptin in pregnant females and exerts a gender-specific effect on the metabolic phenotype of mature offspring. Aim: to study the influence of A^y mutation on sensitivity to diet-induced obesity in male and female offspring, on fetal and placental weight and on the expression of genes in the placentas of the fetuses of different sexes. Body weight and food intake on a standard and an obesogenic diet, fetal and placental weights on pregnancy days 13 and 18, and gene expression of glucose transporters (GLUT1, GLUT3), neutral amino acid transporters (SNAT1, SNAT2, SNAT4), insulin-like growth factor 2 IGF2 and its receptor IGF2R were measured in male and female offspring of a/a (control) and A^y/a mothers. A^y mutation influenced the body weight only in male offspring, which consumed a standard diet, and did not influence obesity development in both male and female offspring. The weight of fetuses and placentas in A^y/a as compared to a/a females was reduced on day 13 of pregnancy and was not different on day 18. On day 13 of pregnancy, the mRNA levels of the examined genes did not differ in placentas of male and female fetuses in a/a females. In A^y/a females, the gene expression of GLUT1, GLUT3, SNAT1 and SNAT4 was reduced in female placentas compared to male placentas. The results suggest that the sex-specific transcription response of placentas to elevated leptin levels in pregnant A^y/a females can mediate the gender-specific impact of A^y mutation on the offspring metabolism in postnatal life.

Key words: A^y mutation; leptin; placenta; fetus; mice; gene expression.

Согласно гипотезе DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease), причины, определяющие склонность к развитию хронических заболеваний, лежат в условиях пренатального и раннего постнатального периода жизни особей (Wadhwa et al., 2009; Hoffman et al., 2017). Показано, что недостаточное и избыточное питание, ожирение, диабет в период беременности ассоциированы с повышенным риском возникновения ожирения и связанного с ним диабета 2-го типа у потомства (Vickers, 2014). Это диктует необходимость коррекции развития потомства на ранних этапах жизни у матерей, страдающих метаболическими расстройствами. Для разработки подходов к такой коррекции необходимо изучение молекулярных механизмов, опосредующих влияние материнской среды на метаболический фенотип потомства.

Основную роль в формировании материнской внутриутробной среды играет плацента (Sferruzzi-Perri, Camm, 2016). Она поставляет питательные вещества и факторы роста развивающимся плодам, а транспортная и сигнальная функции плацент определяют скорость роста плодов и массу тела у новорожденных (Grillo et al., 2008; Coan et al., 2010; Sferruzzi-Perri, Camm, 2016). В свою очередь масса новорожденных является маркером их дальнейшего здоровья, поскольку как слишком низкая, так и слишком большая масса при рождении ассоциированы с повышенным риском развития кардиометаболических заболеваний в зрелости (Vickers, 2014). Предполагается, что метаболические нарушения у матерей сопровождаются изменениями в биохимическом составе крови, а также в структуре и функции плацент, что приводит к эпигенетическим модификациям у плода, влияющим на экспрессию генов и дальнейшее развитие (McKau, Mathers, 2011; Vickers, 2014; Bale, 2015; Desai et al., 2015). Однако молекулярные механизмы программирования развития мало исследованы (Bale, 2015) и требуют дальнейшего изучения как у людей, так и на лабораторных моделях.

Как правило, изменения в составе крови, сопровождающие ожирение, включают в себя повышение уровней гормона жировой ткани лептина, инсулина и глюкозы, изменение липидного профиля (Бажан и др., 2005). Вклад каждого из этих факторов в программирующее влияние материнского ожирения на метаболизм потомства мало изучен. На лабораторных моделях показано, что повышенный уровень лептина у матерей во время беременности оказывает влияние на углеводно-жировой обмен у потомства в зрелости, и это влияние может по-разному проявляться у особей разного пола (Pennington et al., 2012; Makarova et al., 2013). Механизмы, посредством которых материнский лептин влияет на развитие плодов, не исследованы. Возможно, он действует на функциональную активность плацент, поскольку в плацентах обнаружена высокая плотность рецепторов к лептину (Hoggard et al., 1997). У мышей мутация *yellow* в локусе агути (A^y) вызывает эктопическую экспрессию белка агути, что приводит к формированию желтой окраски, повышенному потреблению пищи и развитию ожирения с возрастом (Bultman et al., 1992). Ранее мы показали, что самки мышей линии C57Bl с мутацией A^y (генотип A^y/a), которые вступают в размножение на начальных стадиях развития

ожирения, отличаются от самок этой линии (генотип a/a) повышенным потреблением пищи в первую неделю беременности, немного большей массой тела и примерно вдвое более высоким уровнем лептина в крови в период беременности и ничем не отличаются по метаболическим показателям в период лактации (Makarova et al., 2010). Это позволяет рассматривать A^y мышей как модель для изучения программирующего влияния гиперлептинемии матерей, характерной для особей с избыточной массой жира (Frederich et al., 1995), на метаболические признаки у потомства при отсутствии у беременных самок выраженного ожирения. В этой модели мы обнаружили, что при содержании на стандартной диете мужское потомство A^y/a самок отличается по некоторым метаболическим признакам (массе тела, чувствительности к лептину) от мужского потомства a/a самок, тогда как на женское потомство генотип матери не оказывает влияния (Makarova et al., 2013). Полученные данные позволяют предполагать, что гиперлептинемия у беременных самок может по-разному влиять на развитие мужского и женского потомства, и использовать эту модель для изучения механизмов гендер-специфического программирования развития в пренатальный период жизни.

Гендер-специфическое влияние материнской среды может быть опосредовано тем, что плаценты плодов разного пола по-разному реагируют на изменения в составе материнской крови (Gallou-Kabani et al., 2010; Mao et al., 2010; Gabory et al., 2012). Возможно, повышенный во время беременности уровень лептина у A^y самок влияет на функциональную активность плацент, и это влияние зависит от пола плодов.

Целью данной работы было изучение влияния мутации A^y , вызывающей повышение уровня лептина в период беременности, на склонность к развитию диетарного ожирения у потомства разного пола, а также на массу плодов и плацент и экспрессию генов транспортеров глюкозы (GLUT1, GLUT3), нейтральных аминокислот (SNAT1, SNAT2 и SNAT4) и ростовых факторов (инсулиноподобный фактор роста 2 IGF2 и его рецептор IGF2R) в плацентах плодов мужского и женского пола.

Материалы и методы

Экспериментальные животные. Эксперименты проводились в соответствии с международными Европейскими биоэтическими стандартами (86/609-ЕЕС) и Российскими этическими стандартами по содержанию и обращению с лабораторными животными.

В экспериментах использовали мышей линии C57Bl/6J стандартного агути генотипа (a/a) и мышей этой линии, несущих мутацию *yellow* в локусе агути (A^y/a генотип), из вивария Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск). Мышей содержали при световом режиме 12 ч свет : 12 ч темнота и свободном доступе к воде и гранулированному корму для конвенционального содержания и разведения (ЗАО «Ассортимент-Агро», Сергиев Посад, Россия).

В возрасте 8–9 недель самок спаривали с самцами в реципрокных скрещиваниях $a/a \times A^y/a$ и $A^y/a \times a/a$, дающих a/a и A^y/a потомство в отношении 1:1. Покрытие регистрировали по вагинальной пробке, день обнаружения пробки

считали нулевым днем беременности. После покрытия самок переводили на индивидуальное содержание.

Для измерения массы плацент и плодов a/a и A^y/a самок умерщвляли смещением шейных позвонков на 13-й либо на 18-й день беременности, извлекали матку с плодами, помещали ее на охлажденную платформу, высвобождали плоды и плаценты и взвешивали плаценты и плоды на 13-й день беременности на торсионных весах (размерность шкалы до 0.5 мг), а плоды на 18-й день беременности на электрических весах (размерность шкалы до 10 мг). Пол плодов на 18-й день беременности определяли визуально по наличию семенников или матки, на 13-й день беременности у плодов забирали образцы ткани печени и помещали их в жидкий азот для дальнейшего определения пола методом ПЦР. На 13-й день беременности забирали образцы тканей плацент для определения экспрессии генов и помещали их в жидкий азот. Массу плодов и плацент подсчитывали для самок с количеством плодов шесть или семь (12 a/a и 13 A^y/a самок на 13-й день беременности и 13 a/a и 18 A^y/a самок на 18-й день беременности).

Для оценки влияния агути-генотипа самок на метаболический фенотип потомства регистрировали дату родов и размер помета. День родов считали первым днем постнатальной жизни, у самок с пометом из шести или семи детенышей (всего 12 самок a/a и 15 самок A^y/a генотипов) взвешивали мышат в день 1, 7, 14, 21, 28 постнатальной жизни, генотип детенышей определяли на 7-й день, пол – на 14-й. На 28-й день после рождения детенышей отсаживали, по одной самке и одному самцу a/a генотипа из каждого помета содержали индивидуально в течение 12 недель (с 4 по 16 неделю постнатальной жизни) на стандартном корме, еженедельно измеряли массу тела и количество потребленного корма. Начиная с 16-й недели половину животных содержали на стандартной диете, другую половину переводили на сладко-жирную диету, для чего к стандартному корму добавляли семя подсолнечника в кожуре, сдобное сладкое печенье и свиное сало, продолжая еженедельно измерять массу и количество потребленного стандартного корма. Через 8 недель содержания на диете (с 16 по 24 неделю жизни) животных подвергали декапитации, собирали образцы крови в пробирки с ЭДТА, оценивали количество внутривисцерального жира. В образцах плазмы крови измеряли концентрации лептина и глюкозы.

Концентрацию лептина в плазме крови измеряли иммуноферментным методом с помощью коммерческого набора (R&D Systems, Миннеаполис, США), концентрацию глюкозы – коммерческим набором Fluitest GLU (Analyticon Biotechnologies AG, Лихтенфельс, Германия), следуя инструкциям производителя.

Определение пола плодов на 13-й день беременности. Пол плодов определяли с помощью ПЦР с геномной ДНК с детекцией продукта в агарозном геле с использованием праймеров SX_F, 5'-GATGATTTGAGTGGAAATGTGAG GTA-3'; SX_R, 5'-CTTATGTTTATAGGCATGCACCATG TA-3' (McFarlane et al., 2013). В ходе реакции амплифицировались фрагменты псевдоаутосомных генов *Sly* (сцеплен с Y-хромосомой, дает один фрагмент размером 280 п. н.) и *Xlr* (сцеплен с X-хромосомой, дает два фрагмента длиной 685 и 480 п. н.) (рис. 1). ДНК выделяли из печени

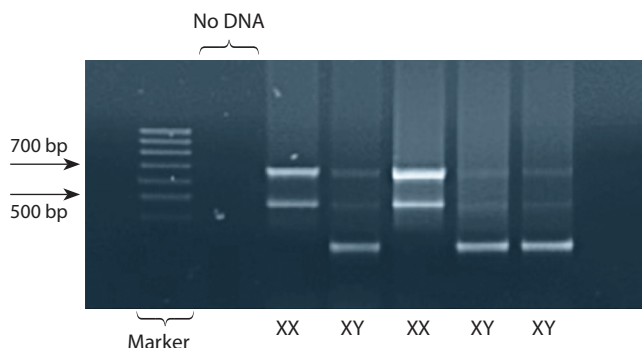


Fig. 1. Electrophoresis of amplification products of *Sly* and *Xlr* gene fragments.

плодов солевым методом по протоколу, предложенному в (Aljanabi, Martinez, 1997).

Для оценки экспрессии генов в плацентах выбрали по шесть самок каждого генотипа с примерно равным представительством плодов мужского и женского пола. Для каждой из отобранных самок формировали две пробы РНК, объединенные по полу плодов, для чего объединяли по отдельности РНК из плацент плодов мужского и женского пола так, чтобы представительство РНК из каждого образца было одинаковым.

Уровень мРНК генов в плацентах определяли методом относительной оценки с помощью обратной транскрипции и полимеразно-цепной реакции в реальном времени (Relative quantitation real-time PCR). Из образцов плацент выделяли РНК с использованием реагента для выделения суммарной РНК ExtractRNA («Евроген», Москва, Россия), согласно инструкции производителя. Обратную транскрипцию проводили с использованием MMLV обратной транскриптазы («Евроген») и олиго-dT праймера по протоколу производителя.

ПЦР проводили на приборе Applied Biosystems®, ViiA™ 7 согласно инструкции с помощью готовой реакционной смеси qPCRmix-HS LowROX («Евроген») и реагентов фирмы Applied Biosystems: TaqMan Gene Expression Assay для генов мыши (*Igf2*, Mm00439564_m1; *Igf2R*, Mm00439576_m1; *Slc2a1* (*Glut1*), Mm00441480_m1; *Slc2a3* (*Glut3*), Mm00441483_m1; *Slc38a1* (*SNAT1*), Mm00506391_m1; *Slc38a2* (*SNAT2*), Mm00628416_m1; *Slc38a4* (*SNAT4*), Mm00459056_m1; *ObRb-LepR*, Mm00440181_m1) с использованием β -актина в качестве эндогенного контроля (TaqMan endogenous controls with FAM dye label and MGB mouse β -actin (*ACTB*)). Относительную экспрессию подсчитывали по пороговому циклу амплификации (относительный CT-метод).

Статистическая обработка. Для оценки влияния генотипа самок мышей на потребление пищи и изменения массы тела у потомства с возрастом использовали дисперсионный анализ (ANOVA) с градациями факторов: «генотип матери» (a/a , A^y/a), «пол» потомства, «возраст» (5–16 недель), с последующей оценкой межгрупповых различий с помощью *post-hoc* критерия Дункана. Далее использовали двухфакторный дисперсионный анализ отдельно для самцов и самок мышей с градациями факторов «генотип матери» и «возраст». Влияние генотипа самок

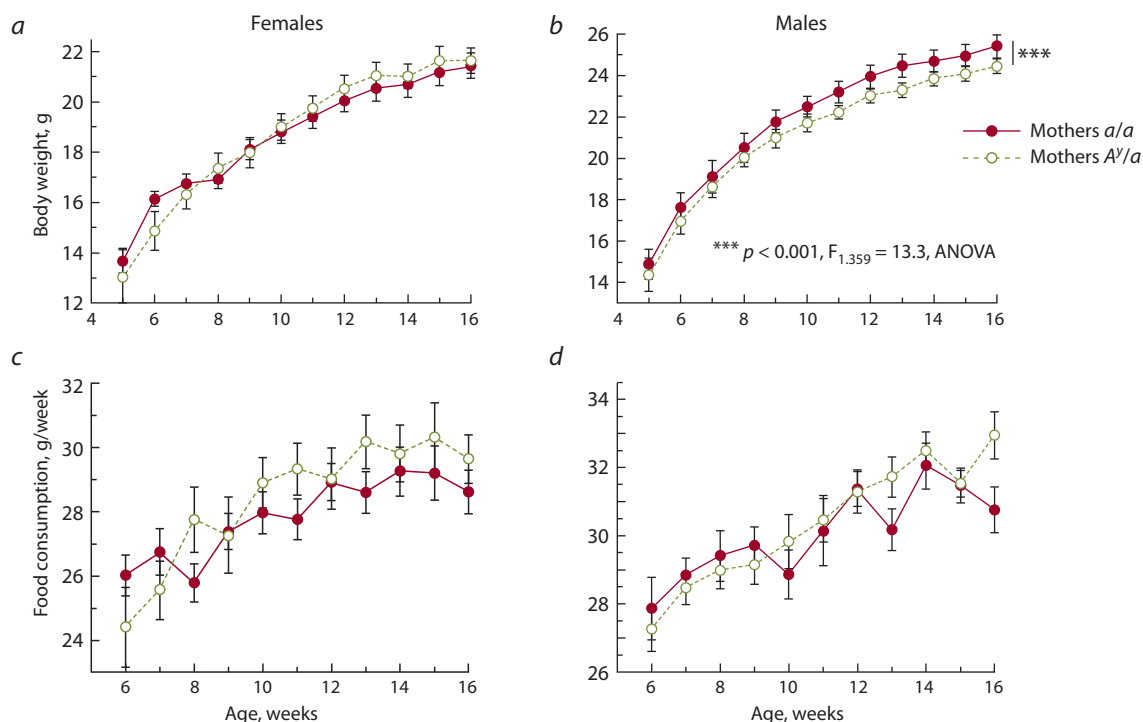


Fig. 2. Effect of the agouti phenotype on body weight and food consumption in the male and female progeny after weaning. Hereafter data are shown as $M \pm SEM$.

мышей на развитие ожирения у потомства оценивали с помощью дисперсионного анализа с градациями факторов «генотип матери», «пол», «диета» для параметров крови и доли жира; «генотип матери», «время содержания на диете» (16–24 недели) и «диета» по отдельности у мужского и женского потомства для массы тела. Массу плодов и плацент и экспрессию генов в плацентах анализировали с помощью ANOVA с градациями факторов «генотип матери» и «пол». Для выявления межгрупповых различий по необходимости использовали t -критерий Стьюдента. Результаты на графиках представлены в виде значений среднего $\pm$ ошибка среднего.

Результаты

Влияние агути генотипа самок на рост детенышей в период материнской опеки, массу тела и потребление пищи после отъема от матерей с 4 по 16 неделю жизни и развитие диет-индуцированного ожирения

Генотип самок не оказывал влияния на рост потомства в период материнской опеки. Детеныши, рожденные самками a/a и A^y/a генотипов, не различались по массе тела с 1-го по 28-й день жизни.

Генотип самок не оказывал влияния на потребление пищи ни у мужского, ни у женского потомства (рис. 2, в, г), но оказывал отсроченное, зависящее от пола влияние на массу тела после отъема от матерей. У женского потомства, полученного от a/a и A^y/a самок, масса тела не различалась (см. рис. 2, а). У мужского потомства генотип матери оказывал достоверное влияние на массу тела с 5 по 16 недели жизни ($p < 0.001$, $F_{1,359} = 13.3$, 2-way ANOVA)

(см. рис. 2, б): потомство A^y/a матерей обладало меньшей массой тела, чем потомство a/a матерей. Отношение потребления пищи к массе тела было повышенным у мужского потомства A^y/a матерей по сравнению с мужским потомством a/a матерей ($p < 0.01$, $F_{1,305} = 9.97$, 2-way ANOVA).

Сладко-жирная пища вызывала развитие ожирения как у самцов ($p < 0.000^*$, $F_{1,234} = 55.85$), так и у самок ($p < 0.000^*$, $F_{1,445} = 53.5$, 3-way ANOVA) (рис. 3). Кроме того, у самцов выявлено достоверное взаимодействие факторов материнского генотипа и диеты ($p < 0.05$, $F_{1,234} = 4.25$), что свидетельствует о различном влиянии материнского генотипа на массу тела самцов при содержании на разных диетах: генотип матери оказывал достоверное влияние на массу тела только при содержании на стандартной диете ($p < 0.05$, $F_{1,116} = 4.7$) (см. рис. 3) и не оказывал влияния при содержании на сладко-жирной пище. У женского потомства генотип матери не оказывал достоверного влияния на массу тела ни на стандартной диете, ни на сладко-жирной пище.

Содержание внутрибрюшинного жира, концентрации лептина и глюкозы в крови возрастали при ожирении ($p < 0.01$ для всех, $F_{1,52} = 16.7$, $F_{1,42} = 7.7$, $F_{1,43} = 22.8$ для жира, лептина и глюкозы соответственно). Эти показатели не зависели от генотипа матери и пола (табл. 1).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что у мышей мутация A^y , вызывающая хроническую гиперлептемию при беременности, оказывает зависящее от пола программирующее влияние на метаболический фенотип потомства и не предрасполагает потомство к развитию алиментарного ожирения.

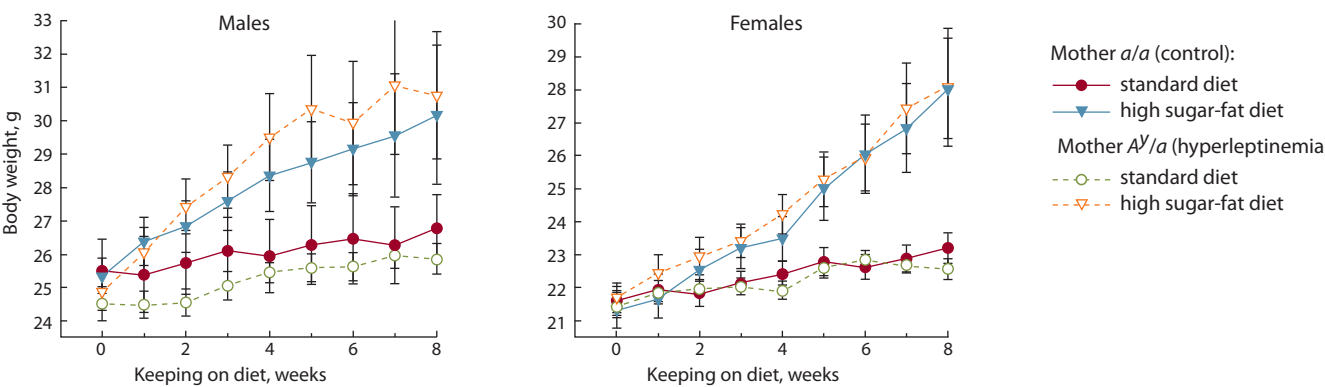


Fig 3. Effect of the agouti phenotype on the development of diet-induced obesity in the male and female progeny in maturity.

Table 1. Effect of sugar-fat diet on the amount of visceral fat and concentrations of leptin and glucose in blood plasma of the male and female progeny of *a/a* and *A^y/a* female mice

Parameter	Female progeny				Male progeny			
	Standard diet		High sugar-fat diet		Standard diet		High sugar-fat diet	
	<i>a/a</i>	<i>A^y/a</i>	<i>a/a</i>	<i>A^y/a</i>	<i>a/a</i>	<i>A^y/a</i>	<i>a/a</i>	<i>A^y/a</i>
Fat, g	0.3±0.0 (7)	0.3±0.1 (5)	1.1±0.2 (8)	1.8±0.8 (6)	0.4±0.1 (7)	0.3±0.1 (5)	1.2±0.5 (6)	1.1±0.4 (8)
Fat, %	1.4±0.1 (7)	1.5±0.3 (5)	4.2±0.8 (8)	5.3±2.0 (6)	1.6±0.4 (7)	1.3±0.2 (5)	3.7±1.2 (6)	3.5±0.6 (8)
Leptin, ng/mL	2.9±0.7 (6)	1.8±0.3 (5)	7.4±2.3 (8)	15.2±6.3 (6)	2.9±0.9 (6)	2.0±0.7 (5)	4.6±1.8 (5)	5.8±0.7 (7)
Glucose, mM	8.9±0.2 (7)	8.5±0.9 (5)	11.8±0.7 (8)	10.5±0.8 (6)	8.5±0.7 (6)	9.9±0.8 (5)	12.0±1.7 (5)	12.8±0.9 (7)

The results are shown as M ± SEM, numbers of cases are shown in parentheses.

Table 2. Effect of the *A^y* mutation of the weights of female mice, fetuses, and placentas of days 13 and 18 of gestation

Weight	<i>a/a</i>		<i>A^y/a</i>	
	Day 13	Day 18	Day 13	Day 18
Body, g	27.0±0.65 (11)	31.1±1.1 (13)	26.7±0.53 (13)	32.8±1.0 (18)
Male fetuses, mg	140.4±4.7 (22)	1081±20 (37)	127.0±2.4 (31)*	1100±20 (54)
Female fetuses, mg	132.6±2.9 (36)	1067±16 (46)	124.7±2.8 (41)	1097±16 (60)
Male placentas, mg	96.7±3.9 (24)^	116.6±6.4 (37)	87.0±4.2 (31)^*	120.0±4.3 (54)^
Female placentas, mg	84.7±2.5 (37)	104.0±3.7 (46)	80.8±2.8 (41)*	104.2±3.0 (60)

* $p < 0.05$ (post-hoc Duncan test), *A^y/a* as compared to *a/a*; ^ $p < 0.05$ (post-hoc Duncan test), males compared to females.

The results are shown as M ± SEM, numbers of cases are shown in parentheses.

Влияние мутации *A^y* на массу плодов и плацент

Самки *a/a* и *A^y/a* генотипов не различались по массе тела ни на 13-й, ни на 18-й день беременности. Они не отличались также друг от друга по массе плодов и плацент на 18-й день беременности. На 13-й день беременности масса плодов обоих полов и их плацент у *A^y/a* самок была ниже, чем у контрольных самок ($p = 0.001$, $F_{1,126} = 11.2$ для плодов; $p < 0.05$, $F_{1,129} = 4.2$ для плацент) (табл. 2). У *A^y/a* по сравнению с *a/a* самками масса мужских плодов была снижена на 9.6 %, масса их плацент – на 10 %, масса женских плодов – на 6 %, масса их плацент – на 4.6 %. Плоды мужского и женского пола не различались по массе, тогда как плаценты плодов мужского пола весили больше плацент плодов женского пола и на 13-й, и на 18-й день бе-

ременности ($p < 0.01$, $F_{1,129} = 7.4$ на 13-й день; $F_{1,193} = 10.8$ на 18-й день беременности) (см. табл. 2).

Экспрессия генов в плацентах

Поскольку генотип самки оказывал выраженное влияние на массу плодов только на 13-й день беременности, мы решили оценить экспрессию генов в плацентах именно на этом сроке. Рост плодов зависит от интенсивности транспорта питательных веществ через плаценту и от сигнальных факторов, секретируемых плацентами в кровь плодов. Поэтому в плацентах мы оценивали уровни мРНК генов, кодирующих переносчики глюкозы (GLUT1, GLUT3), переносчики нейтральных аминокислот (SNAT1, SNAT2, SNAT4), а также уровни мРНК генов, кодирующих IGF2,

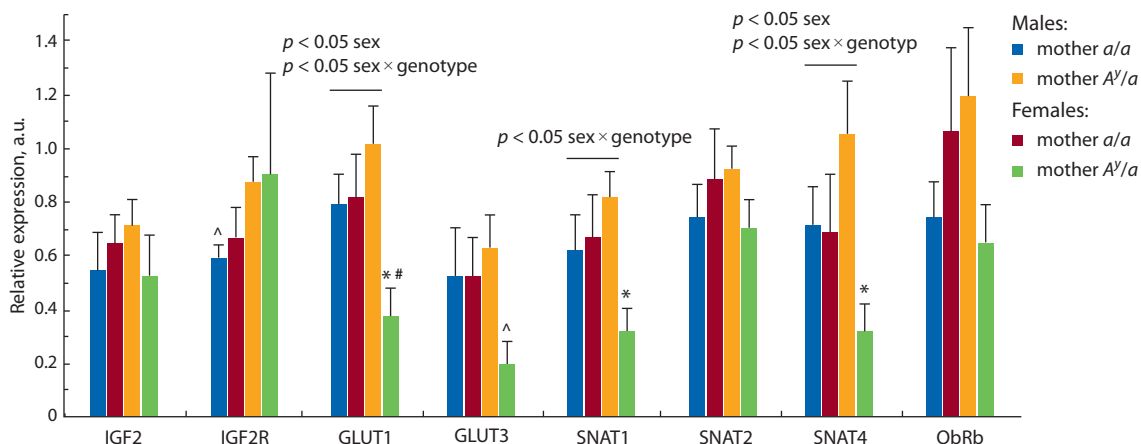


Fig. 4. Effect of the A^y mutation in mice on the expression of genes for transport and signaling proteins in placentas of male and female embryos on day 13 of gestation.

* $p < 0.05$ between male and female placentas in A^y/a mothers (post-hoc Duncan test); # $p < 0.05$ between female placentas in A^y/a and a/a mothers (post-hoc Duncan test); ^ $p < 0.05$ (Student's t test) between male and female placentas in A^y/a mothers for GLUT3 and between male placentas in in A^y/a and a/a mothers for IGF2R.

который усиливает процессы роста в плаценте и у плода, и IGF2R – рецептора к IGF2, при связывании с которым комплекс лиганд-рецептор интернализуется и разрушается внутри клетки, вследствие чего снижается активность IGF2. Результаты представлены на рис. 4.

Дисперсионный анализ выявил достоверное взаимодействие факторов материнского генотипа и пола плодов на экспрессию генов, кодирующих GLUT1, SNAT1 и SNAT4 ($p < 0.05$ для всех, $F_{1,20} = 6.56$ для GLUT1, $F_{1,20} = 4.9$ для SNAT1, $F_{1,20} = 4.36$ для SNAT4). Если у контрольных самок уровень мРНК этих генов не различался в плацентах плодов мужского и женского пола, то у A^y/a самок экспрессия этих генов была достоверно ниже в плацентах плодов женского пола по сравнению с плацентами плодов мужского пола. Кроме того, сравнение межгрупповых средних по критерию Стьюдента показало, что у A^y/a самок экспрессия GLUT3 в плацентах плодов женского пола была ниже, чем в плацентах плодов мужского пола, а экспрессия гена рецептора к IGF2 в плацентах плодов мужского пола была выше у A^y/a самок по сравнению с a/a самками. Полученные результаты показывают, что мутация A^y оказывает влияние на экспрессию плацентарных генов, регулирующих рост плодов, и это влияние зависит от пола плодов.

Обсуждение

Данное исследование было предпринято для того, чтобы оценить влияние мутации A^y у мышей на склонность к развитию ожирения у потомства разного пола и для проверки предположения, что гендер-специфическое влияние мутации на метаболический фенотип потомства может быть связано с различающейся в зависимости от пола плодов реакцией плацент на изменения материнской среды, вызванные этой мутацией.

Результаты подтвердили полученные ранее данные о том, что мутация оказывает гендер-специфическое отсроченное влияние на метаболизм потомства: снижает массу тела только у мужского потомства при содержании в

стандартных условиях (Makarova et al., 2013). Поскольку в период беременности A^y/a самки отличаются от a/a самок повышенным уровнем лептина и не различаются по другим биохимическим показателям крови (кортикостерон, глюкоза, инсулин) (Makarova et al., 2010), мы предполагаем, что отсроченные материнские воздействия связаны с влиянием именно лептина на развивающееся потомство. Ранее нами установлено, что однократное введение лептина в конце беременности снижает массу тела у потомства на стандартной диете (Makarova et al., 2013). В исследованиях других авторов тоже обнаружено, и в генетической модели, и при введении лептина, что гиперлептинемия при беременности сопровождается меньшей массой у потомства, причем у крыс масса была снижена только у женского потомства (Nilsson et al., 2003), а у мышей – вне зависимости от пола (Pollock et al., 2015). Меньшая масса тела у мужского потомства A^y/a самок по сравнению с потомством a/a самок наблюдалась при одинаковом потреблении пищи, что предполагает более интенсивный расход энергии у этих животных. В работе на мышах показано (Pollock et al., 2015), что гиперлептинемия беременности ассоциирована с повышенной двигательной активностью у потомства. Возможно, у мужского потомства A^y/a самок тоже повышена двигательная активность, этот вопрос требует дальнейшего изучения.

Гиперлептинемия у самок с мутацией A^y не повлияла на исследованные нами метаболические характеристики у потомства при развитии ожирения на сладко-жирной диете. Эти результаты отличаются от данных, полученных другими авторами в экспериментах на мышах и крысах. У крыс введение лептина в конце беременности и в период лактации подавляло развитие ожирения, индуцированного диетой, у потомства обоих полов (Stocker et al., 2007). У мышей повышенный уровень лептина у беременных $db/+$ самок мышей и введение лептина в течение всей беременности и первых дней после родов снижали массу тела у потомства на диете, индуцирующей ожирение (Pollock et al., 2015), не изменяя при этом

процентного содержания жира (Talton et al., 2016), что говорит о влиянии материнского лептина на линейный рост потомства, а не на развитие ожирения как такового. Несовпадение результатов по реакции потомства на диету, индуцирующую ожирение, в нашей модели и в моделях, использованных другими авторами (Pollock et al., 2015), может быть обусловлено особенностями проведения экспериментов, такими как состав диеты или концентрации лептина в крови самок на разных сроках беременности и лактации. В целом результаты подтверждают положение о том, что повышенный уровень лептина в крови у беременных самок не предрасполагает потомство к развитию ожирения, индуцированного диетой, и указывают на то, что материнский лептин может по-разному воздействовать на развитие мужского и женского потомства.

Механизмы программирующего действия лептина практически не изучены. Поскольку скорость роста плодов отражает множественные влияния материнской среды, мы оценили массу плодов у *a/a* и *A^y/a* самок на разных стадиях беременности. Оказалось, что мутация меняет динамику роста плодов: замедляет скорость роста плодов в первые две трети беременности (на 13-й день масса плодов была снижена), а затем, по-видимому, плоды демонстрируют догоняющий рост (в конце беременности масса плодов уже не различалась). По немногочисленным литературным данным, материнский лептин может снижать массу плодов: введение лептина во второй половине беременности снижало массу плодов у мышей (Yamashita et al., 2001) и массу новорожденных крысят (Stocker et al., 2007).

Пропорциональное снижение массы плацент и плодов указывает на то, что уменьшение физических размеров плацента может быть основной причиной замедления роста плодов. К 13-му дню беременности у мышей зона лабиринта, где осуществляется транспорт питательных веществ из крови матери в кровь плода, составляет уже значительную часть плаценты (примерно треть) (Coan et al., 2004), и уменьшение этой зоны может существенным образом сказаться на поставке нутриентов развивающимся плодам. Механизмы влияния лептина на физическое состояние плацент требуют дальнейшего изучения. Возможно, лептин подавляет ангиогенез в плацентах, поскольку в экспериментах *in vitro* было показано, что лептин снижает секрецию эндотелиального фактора роста сосудов (VEGF) клетками цитотрофобласта (Islami et al., 2003).

Ответ со стороны плодов на изменение уровня лептина в материнской крови может зависеть от чувствительности плацент к действию лептина. В работе (Yamashita et al., 2001) показано, что введение лептина снижает массу плодов и плацент только у мышей дикого типа и не влияет на гетерозигот по мутации *db*, несущих одну дозу гена рецептора к лептину. На 13-й день беременности масса плацент у *A^y/a* самок была снижена, а на 18-й день – не различалась, хотя повышенный уровень лептина у *A^y/a* самок наблюдается на обоих сроках беременности. Можно предположить, что с ростом уровня лептина в крови у *A^y/a* самок развивается резистентность к его действию в плацентах. Для проверки этого предположения необходимы дополнительные исследования.

Кроме влияния на физические размеры плацент, повышение уровня лептина у *A^y/a* самок сопровождалось

изменением экспрессии генов транспортеров питательных веществ и сигнальных факторов в плацентах. Введение лептина в первой половине беременности самкам мышей, ограниченным в потреблении белков, вызывало изменения транскриптома в плацентах (Schulz et al., 2012), что указывает на возможность непосредственного влияния материнского лептина на транскрипционные процессы в плацентах. Гендер-специфическое воздействие мутации *A^y* на метаболические признаки у потомства может быть связано с разным транскрипционным ответом плацент у плодов мужского и женского пола на изменения уровня лептина в материнской крови.

Нами обнаружены яркие проявления полового диморфизма по массе плацент у самок обоих генотипов и по экспрессии генов в плацентах у *A^y/a* самок. Мутация *A^y* дифференцирует плаценты плодов разного пола по экспрессии некоторых генов, в основном за счет снижения экспрессии в плацентах плодов женского пола. Снижение экспрессии генов, кодирующих переносчики глюкозы и аминокислот, может быть одной из причин уменьшения массы плодов женского пола. Однако масса плодов мужского пола также была снижена. При этом в плацентах плодов мужского пола у *A^y/a* самок была повышена экспрессия гена, кодирующего IGF2R. Этот рецептор связывается с IGF2 и транспортирует его в лизосомы, таким образом снижая уровень IGF2 во внеклеточном пространстве (Wutz et al., 2001). Повышение экспрессии IGF2R может приводить к снижению уровня IGF2 в плацентах мужских плодов, что может быть причиной снижения массы мужских плодов, поскольку IGF2 стимулирует рост плодов (DeChiara et al., 1990). Кроме того, отсутствие различий в массе плодов разного пола, возможно, связано с развитием компенсаторных механизмов. Наличие таких механизмов продемонстрировано в работах, в которых исследовалось изменение экспрессии IGF2 и транспортеров глюкозы и аминокислот в плацентах. Показано, что в ответ на снижение уровня экспрессии гена IGF2 в плацентах происходит компенсаторное усиление вторичного транспорта аминокислот, опосредованного белками-переносчиками системы A (Constância et al., 2005), и наоборот – в ответ на усиление экспрессии IGF2 происходит снижение экспрессии транспортера глюкозы GLUT3 и транспортера нейтральных аминокислот SNAT4 (Angiolini et al., 2011).

Гендер-специфический ответ со стороны плацент на материнские воздействия является хорошо установленным феноменом. У мышей плаценты плодов разного пола по-разному отвечали на материнское ожирение (Kim et al., 2014), диету матерей (Gallou-Kabani et al., 2010; Mao et al., 2010; Gabory et al., 2012), гипоксию (Cuffe et al., 2014), изменение гормонального фона (Cuffe et al., 2011, 2012). Однако вопрос о молекулярных механизмах, лежащих в основе этого явления, до настоящего времени не исследован и ждет своего разрешения.

Несмотря на то что масса плацент и плодов у *A^y/a* самок была снижена независимо от пола плодов и экспрессия генов была изменена также в плацентах плодов обоего пола, отсроченные влияния генотипа матери на метаболические признаки были обнаружены только у мужского потомства. Скорее всего, это связано с выбором изученных признаков. Для самок наиболее значимым признаком с эволюционной

точки зрения является плодовитость. Возможно, агути генотип самок влияет на параметры плодовитости у женского потомства, но этот вопрос до сих пор не изучался.

Заключение

У мышей мутация *A^y*, вызывающая гиперлептинемия в период беременности, оказывает зависящее от пола влияние на метаболический фенотип потомства в зрелости, влияет на массу плацент и динамику роста плодов, а также вызывает различия по экспрессии генов сигнальных и транспортных белков в плацентах плодов мужского и женского пола в середине беременности. Можно предположить, что гендер-специфическое влияние *A^y/a* генотипа самок мышей на метаболические признаки у потомства связано с тем, что развивающаяся у таких самок гиперлептинемия по-разному влияет на экспрессию генов сигнальных и транспортных белков в плацентах плодов разного пола.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, projects 14-04-00694a and 17-04-01357a, and State Budgeted Project 0324-2018-0016. Use of the equipment of the Shared Access Center for Genetic Resources of Laboratory Animals was supported by project RFMEFI62117X0015.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.* 1997;25:4692-4693.
- Angiolini E., Coan P.M., Sandovici I., Iwajomo O.H., Peck G., Burton G.J., Sibley C.P., Reik W., Fowden A.L., Constância M. Developmental adaptations to increased fetal nutrient demand in mouse genetic models of Igf2-mediated overgrowth. *FASEB J.* 2011;25:1737-1745.
- Bale T.L. Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. *Nat. Rev. Neurosci.* 2015;16(6):332-344. DOI 10.1038/nrn3818.
- Bazhan N.M., Yakovleva T.V., Baginskaia N.V., Shevchenko A.Iu., Makarova E.N. Changes of lipid-carbohydrate metabolism during development of melanocortin obesity in the mice with the Agouti yellow mutation. *Rossiyskiy Fiziologicheskii Zhurnal im. I.M. Sechenova* = *I.M. Sechenov Physiological Journal*. 2005;91(12):1445-1453. (in Russian)
- Bultman S.J., Michaud E.J., Woychik R.P. Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell.* 1992;71:1195-1204.
- Coan P.M., Ferguson-Smith A.C., Burton G.J. Developmental dynamics of the definitive mouse placenta assessed by stereology. *Biol. Reprod.* 2004;70(6):1806-1813.
- Coan P.M., Vaughan O.R., Sekita Y., Finn S.L., Burton G.J., Constância M., Fowden A.L. Adaptations in placental phenotype support fetal growth during undernutrition of pregnant mice. *J. Physiol.* 2010;588:527-538.
- Constância M., Angiolini E., Sandovici I., Smith P., Smith R., Kelsey G., Dean W., Ferguson-Smith A., Sibley C.P., Reik W., Fowden A. Adaptation of nutrient supply to fetal demand in the mouse involves interaction between the *Igf2* gene and placental transporter systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005;102(52):19219-19224.
- Cuffe J.S., Dickinson H., Simmons D.G., Moritz K.M. Sex specific changes in placental growth and MAPK following short term maternal dexamethasone exposure in the mouse. *Placenta.* 2011;32(12):981-989. DOI 10.1016/j.placenta.2011.09.009.
- Cuffe J.S., O'Sullivan L., Simmons D.G., Anderson S.T., Moritz K.M. Maternal corticosterone exposure in the mouse has sex-specific effects on placental growth and mRNA expression. *Endocrinology.* 2012;153(11):5500-5511. DOI 10.1210/en.2012-1479.
- Cuffe J.S., Walton S.L., Singh R.R., Spiers J.G., Bielefeldt-Ohmann H., Wilkinson L., Little M.H., Moritz K.M. Mid- to late term hypoxia in the mouse alters placental morphology, glucocorticoid regulatory pathways and nutrient transporters in a sex-specific manner. *J. Physiol.* 2014;592(14):3127-3141. DOI 10.1113/jphysiol.2014.272856.
- DeChiara T.M., Efstratiadis A., Robertson E.J. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature.* 1990;45:78-80.
- Desai M., Jellyman J.K., Ross M.G. Epigenomics, gestational programming and risk of metabolic syndrome. *Int. J. Obes. (Lond).* 2015;39(4):633-641. DOI 10.1038/ijo.2015.13.
- Frederich R.C., Hamann A., Anderson S., Löllmann B., Lowell B.B., Flier J.S. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat. Med.* 1995;1:1311-1314.
- Gabory A., Ferry L., Fajardy I., Jouneau L., Gothié J.D., Vigé A., Fleur C., Mayeur S., Gallou-Kabani C., Gross M.S., Attig L., Vambergue A., Lesage J., Reusens B., Vieau D., Remacle C., Jais J.P., Junien C. Maternal diets trigger sex-specific divergent trajectories of gene expression and epigenetic systems in mouse placenta. *PLoS One.* 2012;7(11):e47986. DOI 10.1371/journal.pone.0047986.
- Gallou-Kabani C., Gabory A., Tost J., Karimi M., Mayeur S., Lesage J., Boudadi E., Gross M.S., Taurelle J., Vigé A., Breton C., Reusens B., Remacle C., Vieau D., Ekström T.J., Jais J.P., Junien C. Sex- and diet-specific changes of imprinted gene expression and DNA methylation in mouse placenta under a high-fat diet. *PLoS One.* 2010;5(12):e14398. DOI 10.1371/journal.pone.0014398.
- Grillo M.A., Lanza A., Colombatto S. Transport of amino acids through the placenta and their role. *Amino Acids.* 2008;34:517-523.
- Hoffman D.J., Reynolds R.M., Hardy D.B. Developmental origins of health and disease: current knowledge and potential mechanisms. *Nutr. Rev.* 2017;75(12):951-970. DOI 10.1093/nutrit/nux053.
- Hoggard N., Hunter L., Duncan J.S., Williams L.M., Trayhurn P., Mercer J.G. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997;94(20):11073-11078.
- Islami D., Bischof P., Chardonnes D. Modulation of placental vascular endothelial growth factor by leptin and hCG. *Mol. Hum. Reprod.* 2003;9(7):395-398. DOI 10.1093/molehr/gag053.
- Kim D.W., Young S.L., Grattan D.R., Jasoni C.L. Obesity during pregnancy disrupts placental morphology, cell proliferation, and inflammation in a sex-specific manner across gestation in the mouse. *Biol. Reprod.* 2014;90:130. DOI 10.1095/biolreprod.113.117259.
- Makarova E.N., Chepeleva E.V., Panchenko P.E., Bazhan N.M. Influence of abnormally high leptin levels during pregnancy on metabolic phenotypes in progeny mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2013;305:R1268-R1280.
- Makarova E.N., Yakovleva T.V., Shevchenko A.Y., Bazhan N.M. Pregnancy and lactation have anti-obesity and anti-diabetic effects in *A^y/a* mice. *Acta. Physiol. (Oxf).* 2010;198(2):169-177. DOI 10.1111/j.1748-1716.2009.02046.x.
- Mao J., Zhang X., Sieli P.T., Falduto M.T., Torres K.E., Rosenfeld C.S. Contrasting effects of different maternal diets on sexually dimorphic gene expression in the murine placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010;107(12):5557-5562.
- McFarlane L., Truong V., Palmer J.S., Wilhelm D. Novel PCR assay for determining the genetic sex of mice. *Sex. Dev.* 2013;7:207-211. DOI 10.1159/000348677.
- McKay J.A., Mathers J.C. Diet induced epigenetic changes and their implications for health. *Acta. Physiol. (Oxf).* 2011;202(2):103-118. DOI 10.1111/j.1748-1716.2011.02278.x.
- Nilsson C., Swolin-Eide D., Ohlsson C., Eriksson E., Ho H.P., Björntorp P., Holmång A. Reductions in adipose tissue and skeletal growth

- in rat adult offspring after prenatal leptin exposure. *J. Endocrinol.* 2003;176:13-21.
- Pennington K.A., Harper J.L., Sigafos A.N., Beffa L.M., Carleton S.M., Phillips C.L., Schulz L.C. Effect of food restriction and leptin supplementation on fetal programming in mice. *Endocrinology.* 2012;153:4556-4567.
- Pollock K.E., Stevens D., Pennington K.A., Thaisrivongs R., Kaiser J., Ellersieck M.R., Miller D.K., Schulz L.C. Hyperleptinemia during pregnancy decreases adult weight of offspring and is associated with increased offspring locomotor activity in mice. *Endocrinology.* 2015;156:3777-3790.
- Schulz L.C., Schlitt J.M., Caesar G., Pennington K.A. Leptin and the placental response to maternal food restriction during early pregnancy in mice. *Biol. Reprod.* 2012;87(5):120. DOI 10.1095/biolreprod.112.103218.
- Sferruzzi-Perri A.N., Camm E.J. The programming power of the placenta. *Front. Physiol.* 2016;7:33. DOI 10.3389/fphys.2016.00033.
- Stocker C.J., Wargent E., O'Dowd J., Cornick C., Speakman J.R., Arch J.R., Cawthorne M.A. Prevention of diet-induced obesity and impaired glucose tolerance in rats following administration of leptin to their mothers. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2007;292:R1810-R1818.
- Talton O.O., Pennington K.A., Pollock K.E., Bates K., Ma L., Ellersieck M.R., Schulz L.C. Maternal hyperleptinemia improves offspring insulin sensitivity in mice. *Endocrinology.* 2016;157:2636-2648.
- Vickers M.H. Early life nutrition, epigenetics and programming of later life disease. *Nutrients.* 2014;6(6):2165-2178. DOI 10.3390/nu6062165.
- Wadhwa P.D., Buss C., Entringer S., Swanson J.M. Developmental origins of health and disease: brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms. *Semin. Reprod. Med.* 2009;27(5):358-368. DOI 10.1055/s-0029-1237424.
- Wutz A., Theussl H.C., Dausman J., Jaenisch R., Barlow D.P., Wagner E.F. Non-imprinted *Igf2r* expression decreases growth and rescues the *Tme* mutation in mice. *Development.* 2001;128(10):1881-1887.
- Yamashita H., Shao J., Ishizuka T., Klepcyk P.J., Muhlenkamp P., Qiao L., Hoggard N., Friedman J.E. Leptin administration prevents spontaneous gestational diabetes in heterozygous *Lepr^{db/+}* mice: effects on placental leptin and fetal growth. *Endocrinology.* 2001;142:2888-2897.



Interrelation of prions with non-coding RNAs

R.N. Mustafin¹✉, E.K. Khusnutdinova^{1, 2}

¹ Bashkir State University, Ufa, Russia

² Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Research Center RAS, Ufa, Russia

Prions are alternative infectious conformations for some cellular proteins. For the protein PrP^C (PrP – prion protein, C – common), a prion conformation, called PrP^{Sc} (S – scrapie), is pathological. For example, in mammals the PrP^{Sc} prion causes transmissible spongiform encephalopathies accumulating in the brain tissues of PrP^{Sc} aggregates that have amyloid properties. MicroRNAs and long non-coding RNAs can be translated into functional peptides. These peptides can have a regulatory effect on genes from which their non-coding RNAs are transcribed. It has been assumed that prions, like peptides, due to the presence of specific domains, can also activate certain non-coding RNAs. Some of the activated non-coding RNAs can catalyze the formation of new prions from normal protein, playing their role in the pathogenesis of prion diseases. Confirmation of this assumption is the presence of the association of alleles of microRNA with the development of the disease, which indicates the role of the specific sequences of non-coding RNAs in the catalysis of prion formation. In the brain tissues of patients with prion diseases, as well as in exosomes containing an abnormal PrP^{Sc} isoform, changes in the levels of microRNA have been observed. A possible cause is the interaction of the spatial domains of PrP^{Sc} with the sequences of the non-coding RNA genes, which causes a change in their expression. MicroRNAs, in turn, affect the synthesis of long non-coding RNAs. We hypothesize that long noncoding RNAs and possibly microRNAs can interact with PrP^C catalyzing its transformation into PrP^{Sc}. As a result, the number of PrP^{Sc} increases exponentially. In the brain of animals and humans, transposon activity has been observed, which has a regulatory effect on the differentiation of neuronal stem cells. Transposons form the basis of domain structures of long non-coding RNAs. In addition, they are important sources of microRNA. Since prion diseases can arise as sporadic and hereditary cases, and hereditary predisposition is important for the development of pathology, we hypothesize the role of individual features of activation of transposons in the pathogenesis of prion diseases. The activation of transposons in the brain at certain stages of development, as well as under the influence of stress, is reflected in the peculiarities of expression of specific non-coding RNAs that are capable of catalyzing the transition of the PrP^C protein to PrP^{Sc}. Research in this direction can be the basis for targeted anti-microRNA therapy of prion diseases.

Keywords: brain; long noncoding RNA; methylation; microRNA; prions; regulation; stem cells; transmissible spongiform encephalopathies.

Взаимосвязь прионов с некодирующими РНК

Р.Н. Мустафин¹✉, Э.К. Хуснутдинова^{1, 2}

¹ Башкирский государственный университет, Уфа, Россия

² Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, Уфа, Россия

Прионы – это альтернативные инфекционные конформации ряда клеточных белков. В отношении протеина PrP^C (PrP – от англ. prion protein, C – common, обычный) прионная конформация, получившая название PrP^{Sc} (Sc – scrapie, скрепи или почесуха овец), оказалась патологической. У млекопитающих PrP^{Sc} является этиологическим фактором трансмиссивных губчатых энцефалопатий, характеризующихся накоплением в головном мозге агрегатов PrP^{Sc}, которые обладают амилоидными свойствами. МикроРНК и длинные некодирующие РНК могут транслироваться в функциональные пептиды, оказывающие регуляторное воздействие на гены, продуктами которых они служат. Сделано предположение о роли активации специфических некодирующих РНК под влиянием прионов в качестве одного из механизмов патогенеза прионных болезней. Обнаружены изменения уровней микроРНК в тканях головного мозга, а также в экзосомах, содержащих аномальную изоформу PrP^{Sc} у больных трансмиссивными губчатыми энцефалопатиями. Выявлены ассоциации аллелей микроРНК с развитием болезни, что говорит о возможной роли специфических последовательностей некодирующих РНК в катализе образования прионов из нормального белка. Предполагается, что измененные N-концевые пространственные домены PrP^{Sc} способны связываться с регуляторными последовательностями специфических генов некодирующих РНК. В результате активируется экспрессия данных некодирующих РНК, которые, в свою очередь, могут взаимодействовать с PrP^C, катализируя их преобразование в PrP^{Sc}. Происходит экспоненциальный рост количества PrP^{Sc}. В головном мозге животных и человека наблюдается активность мобильных элементов, оказывающие регуляторное влияние на дифференцировку нейрональных стволовых клеток. Транспозоны составляют основу доменных структур длинных некодирующих РНК, служат важными источниками микроРНК. Так как прионные болезни могут возникать в виде спорадических и наследственных случаев, а на восприимчивость к заболеванию влияет полиморфизм в белок-кодирующих генах и генах микроРНК, можно предположить роль роль специфического состава и особенностей функционирования транспозонов в их патогенезе. Активация транспозонов в головном мозге на определенных



стадиях развития, а также под действием стресса отражается в характере экспрессии специфических некодирующих РНК, способных катализировать переход белка PrP^C в PrP^{Sc}. Исследование в данном направлении может стать основой для таргетной терапии прионных болезней с использованием микроРНК в качестве мишеней.

Ключевые слова: головной мозг; длинные некодирующие РНК; метилирование; микроРНК; прионы; регуляция; стволовые клетки; трансмиссивные губчатые энцефалопатии.

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Mustafin R.N., Khusnutdinova E.K. Interrelation of prions with non-coding RNAs. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(4):415-424. DOI 10.18699/VJ18.377

A term ‘prion’ was coined to mark proteinaceous infectious particles (hence *prions*) that are able to cause prion diseases a.k.a. transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) in mammals. The PrP^{Sc} protein (PrP stands for prion protein S – for scrapie) is an example of such a prion with multiple β -layers that is a product of conformation transformation of the common PrP^C protein (C – for common). However, PrP is not the only protein forming prions, as not all prions are pathogenic.

In the literature, the term has been used to mark self-propagating alternative protein conformations, so this definition can be referred to many amyloid proteins as well. On the other hand, ‘prion’ also means that a protein’s transmissibility has been proved (Harbi, Harrison, 2014).

The term ‘amyloid’ was first coined in 1838 by German botanist M. Schleiden to describe the starch (*amylo* is starch in Latin) component of plants. In 1854, P. Virkhov used this term to refer to the specific reaction of nerve-cell deposits to iodine falsely assuming that these substances are similar to starches. As it turned out later, the deposits were proteins, but they still have been known as amyloids (Kyle, 2001).

Amyloid fibrils are threadlike self-organizing peptide or protein aggregates that contain cross-link β -structures. Ribbon-like β -layers spread along the fibrils in which β -threads go perpendicular to fibril growth direction and are cross-linked by H-bonding. Typical amyloid fibrils have two or more β -layers laying one over the other. The presence of such structures has been proven with x-ray and electron diffraction spectroscopy and solid-state NMR.

Amyloid fibrils are a structural state taken by polypeptides in relatively high concentrations in case they are not able to form more complex structures such as folds for a globular ferment structure or participate in a functional supramolecular complex (Tycko, 2014).

Formation of amyloids presents certain interest for medical studies, because the tissues contaminated by

such amyloid diseases as T2D, neurodegenerative diseases (AD, PD and TSE), accumulate amyloid fibrils (Tycko, 2014). For instance, TSEs are characterized by the infectious properties of the amyloid proteins causing the disease, while the encephalopathies themselves are described as a group of neurodegenerative diseases affecting the nervous system of humans and animals (Saba et al., 2012). In humans TSE causes such conditions as Creutzfeldt – Jacob disease (CJD), Gerstmann–Sträussler–Scheinker syndrome (GSS), and fatal familial insomnia (FFI); in sheep – scrapie and trembling disease; and in cattle – bovine spongiform encephalopathy. Effective diagnostics and treatment of TSEs are complicated by the absence of intravital diagnostic techniques to detect the pre-existing disease (Bellingham et al., 2012). TSEs may also have genetic etiology, occur sporadically without any known factors and gene mutations or can infect through food or contaminated medical tools (see Table) (Saba et al., 2012; Mabbott, 2017).

The cellular prion protein with common three-dimensional structure (PrP^C) is a sialoglycoprotein with glycosphosphatidylinositol anchor characterized by its high level of expression in a central nervous system (CNS), especially in neuron synapses (Rubenstein et al., 2018). Its molecular mass is 30–35 kDa and it is encoded by the *PRNP* gene. After its synthesis PrP^C is first processed in the Golgi until its expression into a plasmatic membrane. The secondary structure of its C-end domain contains three α -spirals and a short double-stranded β -folded layer (Mabbott, 2017). The glycine-rich N-end domain contains an octapeptide repeat composed of four tandem copies of highly conserved sequence PHGGGWGQ. It is assumed that the N-end domain plays an important role in modulating the prion protein’s physiological function as well as in the pathological reactions in case of prion diseases. Multiple studies have demonstrated that the N-end domain can interact with a wide spectrum of ligands such as β -layer rich conformers (in particular PrP^{Sc} in TSE, and the A β 42 peptide in AD); metal ions (Cu²⁺ and Zn²⁺); lipids; glycosaminoglycans (give different, some-

Prion diseases in humans and animals (Mabbott, 2017)

Disease	Infected species	Path of infection
Drug-induced CJD	Humans	Accidental medical contamination
Sporadic CJD	Humans	Somatic mutations or spontaneous conversions of PrP ^C into PrP ^{Sc}
Variant CJD	Humans	Eating contaminated food or transfusion of contaminated blood
Familial CJD	Humans	Germline mutations of the <i>PRNP</i> gene
CSS	Humans	»
Trembling disease	Humans	Ritual cannibalism
FFI	Humans	Germline mutations of the <i>PRNP</i> gene
Mad-cow disease	Bovine cattle	Eating contaminated food
Scrapie	Sheep, goats, moufflons	Eating contaminated food, horizontal and vertical infection
Chronic wasting disease	Mooses, deers	
Mink TSE	Minks	Eating contaminated food
Feline spongiform encephalopathy	Cats	»
Spongiform encephalopathy of exotic animals	Antelopes, Grater kudus	»

times opposite activity properties to the protein including protection from oxidative stress and PrP^{Sc} toxicity mediation); and nucleic acids (Eigenbrod et al., 2017). It also can be assumed that the changed conformation of PrP^{Sc} results in N-end domain disorder modulating its physiological function and enabling it to affect the genes of noncoding RNAs (ncRNA) by interaction with regulatory sequences or their gene regulators activating them in the way the peptides formed while ncRNA translation do. In rare cases, the activated ncRNAs can be a cofactor for the conformational transformation of PrP^C into PrP^{Sc}, and if it happens, it causes a chain reaction with the exponential growth of PrP^{Sc}, which is typical for prion diseases. However, the probability of such activation is negligibly small due to the long incubation period typical for prion diseases.

In a CNS, the physiological development of PrP^C supports myelin homeostasis by interaction with G protein-coupled receptor Gpr126 (a.k.a. Adgrg6) in the

Schwann cells. It has also been reported about many other PrP^C functions in a CNS including a circadian rhythm, synaptic transmission, cognition, signal transduction, apoptosis regulation and protection from oxidative stress. Moreover, PrP^C is expressed in many cellular populations of an immune system and secondary lymphoid organs. Although in mice PrP^C depletion does not lead to apparent immunodeficiency, it can play its role in cellular activation, T-cell differentiation, intercellular interaction and phagocytosis (Mabbott, 2017). PrP^C is a calpain substrate (calcium-sensing cysteine phosphatase that can be subjected to controlled activation) and may become neurotoxic in pathological processing and accumulate in cytosol (Rubenstein et al., 2018). It has also been found that the cellular prion protein of PrP^C works as a receptor for the amyloid fibrils of α -synuclein easing their internalization and endocytosis. Such reactions occur by direct interaction between α -synuclein fibrils and the N-end domain of PrP^C. In the cellular lines express-

ing PrP^{Sc}, binding of PrP^C and the fibrils prevents the formation and accumulation of PrP^{Sc}, as PrP^C becomes inaccessible as the substrate for the pathological transformation (De Cecco, Legname, 2018).

In TSE one detects changes in the secondary, tertiary and quaternary structures of the PrP molecule that lead to increase in the number of β -folded layers. These changes have a strong effect on the physical, chemical and biological characteristics of PrP because the specific pathogenic isoform of PrP^{Sc} is neurotoxic, relatively stable to protease cleavage and accumulates in infected tissues as insoluble aggregates. While particular mechanisms of these conformational and biological changes have been unknown, it has been demonstrated that they require additional chaperone molecules such as lipids, proteoglycans and RNAs (Mabbott, 2017). TSE progressing is related to the exponential growth of PrP^C transformation into its abnormal isoform PrP^{Sc} (Saba et al., 2012), which is characterized by the changed tertiary structure of the molecule, where the α -spirals have transformed to make a new conformation with the β -layers (Simoneau et al., 2015). The characteristic histopathologic CNS changes in TSE include brain vacuolation, neurodegeneration, microgliosis, astrocytosis and pathological accumulation of PrP^{Sc} (Mabbott, 2017).

Similar to other neurodegenerative processes, TSE activates brain-resident immune cells, microglia cells and increases the number of astroglia cells. In many cases, these manifestations of TSE can be detected before the clinical symptoms of the disease or such signs of neurodegeneration as spongiosis and neuron death (Saba et al., 2012). Apart from PrP^{Sc}, there are other elements that can either affect TSE development or determine the clinical phenotype of the disease and susceptibility to a prion infection, e.g. it has been found that PrP^C-coding allelic *PRNP* can participate in TSE pathogenesis. It has also been found that the polymorphism of the *ZBTB38* gene *RASA2* (RAS p21 protein activator 2) is associated with susceptibility to CJD in the UK, while in China an expressed association has been confirmed between SNP *rs57095329* in miR-146a and susceptibility to FFI (Gao et al., 2018). Studying TSE microRNAs as infection diagnostic markers in animals consumed as food has been considered as a perspective direction of research, e.g. in recent studies they used quantitative PCR with inverse transcription to analyze the levels of candidate microRNAs in the blood plasma of scrapie-infected sheep. In this study, a significant association between the disease and the high levels of miR-342-3p и miR-21-5p has been indicated (Sanz Rubio et al., 2017).

Role of microRNAs in prion disease pathogenesis

TSE causes deregulation of certain microRNAs in prion-infected brain tissues (Bellingham et al., 2012). A set of experimental studies was designed and carried out to

determine the role of microRNAs in prion disease pathogenesis. The studies detected deregulation of 15 microRNAs in the brain of prion-infected mice. The expression increased more than 2.5 times for miR-342-3p, miR-320, let-7b, miR-328, miR-128, miR-139-5p, miR-146a, and reduced more than 2.5 times for miR-338-3p and miR-337-3p. In this set of microRNAs neurodegenerative deregulation had been determined only for miR-128, which is a confirmation of the conservative, prion-specific pattern of the microRNA differential expression associated with prion-induced neurodegeneration. For this dataset a lot of potential targets were predicted, including 119 genes whose regulation was disrupted in scrapie-infected mice (Saba et al., 2008).

The hyperexpression of miR-146a occurred simultaneously with prion deposits formation and microglia cells activation. In response to that, the transcription changed significantly including the proinflammatory transcription factors such as nuclear factor kappa-B (NF- κ B) and signal pathways JAK-STAT. Microchip analysis made it possible to predict the role of miR-146a in regulation of the morphological changes in presence of activated microglia cells and phagocytosis mediators of oxidation bursts such as CYBA and NOS3.

Based on the results obtained miR-146a was indicated as a powerful modulator of a microglia cells that regulates their activation during prion-induced neurodegeneration (Saba et al., 2012). Increased expression of has-miR-342-3p and has-miR-494 was also detected in the brain of prion-infected macaques and human CJD models when compared to control groups. Increased expression of has-miR-342-3p was detected in the brain of sporadic CJD-infected humans. This microRNA is supposed to be used TSE diagnostic marker (Montag et al., 2009).

In TSE the early changes observed in brain tissues include reduction of the number of synapses and dendrite spikes followed by reduction of axon length and arborization. These pathological conditions are observed in the preclinical stages of the disease and are followed by changes in expression of the transcripts that include microRNAs. It was discovered that at the early stages of TSE expression of miR-16 increases in hippocampal neurons CA1. Modulation of miR-16 expression in mature hippocampal neurons by expression from a lentivirus imitated the reduction of axon length and arborization observed *in vivo*. An assumption was made that the increased expression of miR-16 causing changes in the regulation of the MAPK/ERK pathways took part in prion disease pathogenesis (Burak et al., 2018). The main molecular mechanisms resulting in a reduction of neural sinuses of the hippocampus and brain cortex in TSE have not yet been detected. However, it has turned out that many microRNAs, many of those enrich synapses, also regulate the local synthesis of protein in case

of rapid response to prion stressors. The study analyzing the processing properties of the microRNAs isolated from synaptoneurosomes at the preclinical and clinical stages of TSE development demonstrated that at the preclinical stage miR-124a-3p, miR-136-5p, miR-376a-3p were enriched. At the following stage, the levels of the microRNAs that were considered deregulated in the brain of TSE-infected mice increased, as well as those in AD models. These were miR-146a-5p, miR-142-3p, miR-143-3p, miR-145a-5p, miR-451a, miR-let-7b, miR-320, miR-150-5p. At the clinical stage of TSE a number of microRNAs decreased their level, including those in relation to the miR-200 family (miR-200a-3p, miR-200b-3p, miR-200c-3p, miR-141-3p, miR-429-3p) and cluster 182 (miR-182-5p, miR-183-5p) (Boese et al., 2016).

In cells PrP^C and PrP^{Sc} associate with exosomes, small (50–130 nm) vesicles released from the cells. The exosomes also contain microRNAs used for identification of microRNA signatures in TSE diagnostics. MicroRNA profiles were studied in the exosomes extracted from prion-infected nerve cells, and the study showed the increased levels of let-7b, let-7i, miR-128a, miR-21, miR-222, miR-29b, miR-343-3p, miR-424. It has confirmed there is a strong connection with microRNA in the neuron exosomes of prion-infected animals and this connection can be used both for TSE diagnostics and finding explanation for possible pathogenic mechanisms of the disease (Bellingham et al., 2012). Apart from studying the expression levels, analysis of the SNP genes participating in dysregulation of hippocampal neurons CA1 in mice with early preclinical TSE stage. The study has shown an expressed association of SNP microRNAs blocking the binding sites of microRNAs and the 3'-UTR genes coding GABA receptor subunits (Saba et al., 2014). The obtained results allow one to assume that in TSE development a special role is given to the ncRNA sequences, which has its effect on their spatial configuration and possible interaction with PrP^C domains and their conformation transformation into PrP^{Sc}. A number of studies have also demonstrated that this transformation requires additional chaperon molecules such as RNAs (Mabbott, 2017). Changing the ncRNA sequences may also be important for a possible interaction with the PrP^{Sc} isoforms that cause the effect similar to that one of peptides produced by translation of ncRNAs (Lv et al., 2016). This interaction with the ncRNA genes may and their regulators may also involve the PrP^C N-end domain. Disruption of its sequence (e.g. during conformation transformation into PrP^{Sc}) becomes important for modulation of the physiological functions of PrP. This assumption is based on a supposition that the PrP^C N-end domain may interact with a wide spectrum of ligands including nucleic-acid sequences (Eigenbrod et al., 2017). However, conformation transformation of the globular

PrP^C domain from α -spirals into PrP^{Sc} β -layers may lead to significant modifications of the N-end domain and affect its capability to interact with the regulatory gene sequences of specific ncRNAs, whose transcription products can serve as catalysts for the transformation of PrP^C into PrP^{Sc}. The result is a chain reaction, since the PrP^{Sc} N-end domains, in their turn, activate ncRNA expression being a catalyst for their transformation.

Regulation of noncoding RNAs by their own translation products

Despite their name, ncRNAs can be translated, and the peptides formed this way have an ability to regulate protein-coding genes (Lv et al., 2016). More than 10% of all the genomes of living organisms are composed of functional genes that contain small open reading frames (smORFs) encoding bioactive peptides (Saghatelian, Couso, 2015). Pre-microRNAs contain smORFs and are capable of both processing into mature microRNAs and of translation into mitochondrial intermediate peptidase (miPEP) that can enhance the transcription of the microRNAs they are bound with (Couzigou et al., 2015). In *Arabidopsis thaliana* each 50-th microRNA contains smORF to translate a pre-microRNA into a peptide. In *Medicago truncatula* miPEP171b is synthesized from pri-miR171b, while in *Arabidopsis thaliana* miPEP165a – from pri-miR165a (Lauressergues et al., 2015), so the biological activity of miPEP has been proven experimentally. Moreover, these peptides are successfully used to optimize the agronomical properties of agricultural plants, e.g. synthetic peptide miPEP172c that activates expression of miR172c stimulating radicle – knob formation in soy plants and increasing its crop yield through symbiotic interaction with nodule bacteria (Couzigou et al., 2016).

Though long noncoding RNAs (lncRNAs) do not contain conservative and long ORFs, they may also interact with ribosomes and translate into functional peptides (Ruiz et al., 2014), e.g. in animals lncRNAs translates into mioregulin, a peptide that controls the effectiveness of muscle contraction and relaxation. The peptide binds with the calcium ATPase of a smooth endoplasmic reticulum (SER) and has a regulatory effect on calcium engulfment (Anderson et al., 2015). In animals, the lncRNA produces the DWORF peptide that also works in SER (Nelson et al., 2016). In plants, the lncRNA produces different peptides such as IPS1 regulating phosphate engulfment; ENOD40 engaging in symbiosis with bacteria; COLDAIR and COOLAIR controlling flowering time (Zhang et al., 2013).

Transposon and noncoding RNA activity in brain

Noncoding RNAs play a vital role in controlling brain development and functioning of mature differentiated nerve cells. Neurogenesis in hippocampus is controlled by gene regulatory networks, transcription factors,

lncRNA and microRNA, while lncRNA play a pivotal role in these processes (Deng et al., 2017). Experimental studies on mouse brain revealed the expression of 849 different lncRNAs, many of those overlapped with the protein-coding genes participating in the nerve function. At the same time these lncRNAs were not the so-called 'transcription noise' or the artifacts of chromatin remodeling (Mercer et al., 2008). Most of the lncRNAs had the expression pattern similar to the one of neurogenesis genes, which tells much about the role of lncRNA in regulation of corticogenesis by adjusting the expression of the determinants of neighboring genome regions in neurons (Aprea et al., 2013).

A strong interrelation has been observed between ncRNAs and transposable elements (TE or transposons) in regulation of stem cells differentiation including neurogenesis. Activation of certain TEs is necessary as for pluripotency support as for sequential stem-cell differentiation. In this case, depletion of certain specific lncRNAs may lead to TE dysregulation and fetal development arrest, e.g. depletion of the *LincGET* lncRNA causes a total arrest of the late G2-phase of bicellular stage in mice. This effect is determined by *LincGET* inability to bind the ILF2, FUBP1 and hnRNP-U proteins and form a complex necessary for the cis-regulatory activity of LTR-containing retro-TE GLN, MERVL, ERVK (Wang et al., 2016). TEs can also be used as lncRNA genes, e.g. to support the identity of fetal stem cells retro-TE HERVH transcribes to become a nuclear lncRNA (Lu et al., 2014). In evolution TEs are used to form the functional domains of lncRNA and become a part of 83 % of them (Johnson, Guigo, 2014). TE activity in brain is observed not only in a fetal period but also in mature humans (Faulkner, 2011), animals and *Drosophila* (Richardson et al., 2014). This activity is assumed to be a source of neuron genetic heterogeneity in developing brain structures (Upton et al., 2015), as TEs have a regulatory function forming transcripts of functional ncRNAs (Gim et al., 2014).

Another role of TEs is to be an important source of microRNAs in animals (Borchert et al., 2011; Gim et al., 2014) and plants (Li et al., 2011; Lorenzetti et al., 2016), which is a confirmation of the universality and conservation of transposons evolution. At the same time, up to 40 % of all the microRNAs that have a regulatory effect on the nerve-cell function are expressed in the brain. Many microRNAs affect neurotransmitter systems. Certain pre-microRNAs are even expressed at in neuron dendrites, where they are locally processed into the mature microRNAs regulating mRNA translation. These are miR-200c, miR-339, miR-332, miR-318, miR-29a, miR-7 и miR-137 enriched in synapses. Other microRNAs as miR-16, miR-221, miR-204, miR-15b are expressed at higher levels in presynaptic axons (Dwivedi, 2014). Another important source of micro-

RNAs is nonautonomous DNA TEs of medium reiteration frequency repeats (MER). On the 14-th day mouse fetuses demonstrate expressed activation of TE MER130 leading to neocortex formation. The nonautonomous TE MER130 that belong to the most important brain genes function as enhancers (Notwell et al., 2015). The close relation of TE and ncRNA can be a confirmation of TE activity in neural stem cells, since microRNAs and lncRNAs regulate gene expression while cellular differentiation. In neurogenesis somatic TE retrotransposition is a potential source of the genotypic neuron variations necessary for brain formation. The highest TE activity in this respect has been detected in the hippocampus, a center of neurogenesis, e.g. a sequence analysis of its cells gave in average 13.7 of the LINE-1 somatic insertions per a single neuron (Upton et al., 2015).

It has also been demonstrated that in TSE hippocampal neurons suffer microRNA deregulation (Burak et al., 2018), and this is a structure with the highest TE activity (Deng et al., 2017), which is assumed to be the basis of neural heterogeneity that plays the pivotal role in brain formation. This may lead to a conclusion that the peculiarities of the certain RNAs related to TEs through their brain regulation function can play their role in TSE development. Such a peculiarity can be accessibility of the certain genome sections containing TE sequences and microRNA genes that allow the PrP^{Sc} domains to interact with them. The result can be enhancement of the specific RNAs, a cascade of interacted processes developing in geometric progression that affects the expression of the certain lncRNAs, which, in their turn, may interact with the PrP^C isoform catalyzing its transition into PrP^{Sc}. It is not unlikely that microRNAs themselves can interact with prions as cofactors causing their conformation transformation. It is apparent that the probability of such events is extremely low, but if it occurs, the pathological process will be exponential, which is confirmed by both prion-disease epidemiology and their development pattern (long incubation period followed by fast development). Since every animal species has its own TE composition and positioning in the genome with its unique effect on the epigenetic properties of its functioning (Mustafin, Khusnutdinova, 2017), the described mechanism of TSE pathogenesis corresponds to the species-specific prion infection pattern.

Role long noncoding RNAs in protein conformation catalysis

The brain may be assumed to be the area where a prion disease develops due to the peculiarities of nerve-cell regulation reflected in expression of the specific microRNAs and lncRNAs affected by TEs. Long ncRNAs take an active part in expression control of the genes necessary for brain development. For example, lncRNA2393 facilitates the differentiation

and proliferation of neural stem cells in the *fascia dentata hippocampi* (Deng et al., 2017), where high TE activity can be observed. Long ncRNAs interact with microRNAs hybridizing with partial complementary sequence and acting as molecular sponges that bind microRNAs and reduce their effect on target mRNAs (Fitzgerald, Caffrey, 2014). Long ncRNAs can catalyze different molecular processes on their own, serving as ribozymes or, which is more often, being a part of ribonucleoproteins (RNPs). Like proteins, lncRNAs have modular spatial organization and contain the discrete domains formed with TE participation (Johnson, Guigo, 2014).

To describe a possible mechanism of how a lncRNA can catalyze the conformation transformation of a common protein into a prion one should consider the similar mechanisms of prion-like domains (PLDs). PLDs enable for the 'functional reaction' of a protein that forms complexes of higher order and microscopic RNP granules. It is considered that protein and RNP concentration in confined space make gene regulation more effective. The biophysical properties of PLD-mediated interactions may explain the liquid-like properties of the RNP granules, as the PLDs expressed *in vitro* form hydrogels, so a PLD is the sequences with a low degree of complexity found the RNA-binding proteins associated with neurodegenerative amyotrophic lateral sclerosis (ALS). PLDs are rich in polar amino acids and glycines and in many ways are similar to the prion yeast protein that can be detected using the hidden Markov models (Hennig, 2015). In many-celled animals PLDs play a very important role in the subcellular cytoplasmic organization, especially in case of RNA homeostasis. In a study to investigate 20 000 protein-coding human genes with Prion-Like Amino Acid Composition (PLAAC) 240 genes (1.2%) turned out to contain the domains, whose structure was similar to the one of annotated prion yeast domains. From the 240 genes 72 (30%) occurred to be RNA-binding ones, while 79 (33%) – DNA-binding. Some of RNA-binding and PLD-containing proteins including ataxin 1, ataxin 2, TDP-43, FUS, TAF15, EWSR1, hnRNP A1, hnRNP A2, are important for the pathogenesis of a number of fatal neurodegenerative diseases such as ALS, frontoparietal dementia, and spinocerebellar ataxia (March et al., 2016). PLDs have also turned out to be important regulators of bacteriophage-prokaryote interaction and can be detected in all the bacteriophages of different bacterial groups and archaeons. These PLDs participate in phage attachment and penetration into a cell as well as in its reproduction (Tetz G., Tetz V., 2017), which is another confirmation of PLD natural universalism.

Low-complexity regions (LCRs) in their relation to proteins are sequences with low diversity of amino-

acid residues if compared to high-complexity regions. LCRs can differ by their recapitulation degree (periodic or aperiodic motifs) and by their composition (homogeneous or heterogeneous). LCRs commonly include micro- and minisatellites, simple repeated sequences, homopolymers, genome heteropolymers, and amino-acid repeated sequences in proteins (Battistuzzi et al., 2016), e.g. glutamine/asparagines (Q/N)-rich domains. For the first time, the relation between LCRs and prion proteins was demonstrated by M.D. Michelitsch и J.S. Weissman (2000), who found that Q/N-rich domains were highly likely to form self-propagating amyloid fibrils. They analyzed complete proteomic sequences of 31 species and a number of incomplete proteomic sequences to detect the Q/N-rich domains to find out that such domains occur in greater numbers in eukaryotic proteins that evolved as modular domains for the protein-protein interaction of 'polar-lightning' type. So, it has been demonstrated that the prion-like regulation in eukaryotic proteins can be a normal process of their multifunctional regulation (Michelitsch, Weissman, 2000). Here it should be reminded that prions are infectious proteins and it is their main property, while a prion-like domain has nothing to do with this infectious property, it just reflects the similarity of the amino-acid sequences and their propensity for aggregation, which allows one to consider PLD as a possible model of the effect ncRNAs have on prion conformation transformations, as TSE can occur as an infection, but in a number of cases it has genetic etiology (Saba et al., 2012; Mabbott, 2017). In addition, a study has confirmed the role PLDs play in the etiology of AA-amyloidosis in animals, which, as prion diseases, can be transmissible (Murakami et al., 2014).

PLDs are involved in liquid-phase transformation – mediated gene regulation that leads to formation of RNP granules. Many PLDs in proteins are binded with paraspeckles, subnuclear bodies formed around lncRNAs. Protein RBM14 binds the key paraspeckle subcomplexes via their mediated PLDs. It takes PLD proteins RBM14 и FUS to form paraspeckles in a cell, where their endogenous copies have been knocked down. They form hydrogel with amyloid-like properties. PLDs launch the liquid-phase transformations, which underlines the importance of this body as a model for understanding of neurodegeneration (Hennig et al., 2015).

Commonly PLDs enable proteins to 'functionally aggregate' forming complexes of higher order and microscopic RNP granules. Proteins and RNAs concentrated in a confined space result in more effective processes of gene regulation, while the biophysical properties of PLD-mediated interactions may explain the liquid – phase properties of the granules since the PLDs expressed *in vitro* form loop-like networks that appear as hydrogels. The hydrogels are functional amyloids, which has been confirmed by a study of RNA-binding

protein FUS (Fused in Sarcoma) containing a PLD with multiple repeats [G/S]Y[G/S]. The central tyrosine is necessary to form hydrogel and stress-granules in cytoplasm. As cytoplasmic RNP granules, nuclear bodies can also form complexes without membrane participation using protein-protein and RNA-protein interactions. Therefore, paraspeckles are nuclear bodies formed based on lncRNA NEAT1 (Nuclear Paraspeckle Assembly Transcript 1/MENε/β). Around 40 protein paraspeckles are known today and most of them are RNA-binding proteins enriched by RNA-recognizing motifs, a zinc finger and a K-homological domain. Paraspeckle occurrence is initiated by NEAT1 transcription followed by enrichment with the different proteins that coordinate paraspeckle accumulation. The genes encoding paraspeckle protein are *FUS*, *TDP-43*, *SS18L1*, *HNRNPA1*, *TAF15*, *EWSR1*. Paraspeckles are sensitive to the stress caused by the structures induced by viral infections; by proteasomes and differentiation. They affect gene expression via keeping RNA in a nucleus through inverted repeats and sequestration of certain transcription factors (Hennig et al., 2015).

Experiments *in vitro* have also demonstrated there is a synergism between RNA effects and PrP^{Sc} amplification. In this study, these were ultrasound-formed small RNA fragments that most easily converted into prions (Gonzalez-Montalban et al., 2011), which allows one to assume that microRNAs may serve as catalysts for PrP^C transformation into PrP^{Sc}. Another study has also demonstrated that RNAs act as cofactors for formation of high-level *de novo* infectious prions facilitating PrP refolding into a pathogenic isoform (Timmes et al., 2013).

Research *in vitro* studied the role of RNAs as the strain-specific components of infectious prions. They demonstrated that depending on a kind of strains the effect of ribonuclease reduced the activity of PrP^{Sc} conversion via protein misfolding cyclic amplification (PMCA) while adding RNA restored the effectiveness of the PMCA conversion. These results have made it possible to assume that RNA molecules can serve as catalysts of prion replication, while the variability of particular prion strains can explain the strain-specific RNA dependencies (Saa et al., 2012).

Searching for the factor facilitating PrP^{Sc} infectivity was carried out in (Simoneau et al., 2015). The experiments showed that initially nonpathogenic recPrP similar to PrP^C could initiate a prion disease in hamsters via its prion-like conformation (rich in β-layers) in presence of the RNAs purified of their scrapie-associated fibrils. Analysis of the infectious recPrP-RNA mixture detected two populations of small RNAs of 27 and 55 nucleotides in size, demonstrating a clear relation between the specific RNAs and the infectious properties of the prion amyloid (Simoneau et al., 2015).

Thus, there have been growing amount of proves of the role specific ncRNAs play in the pathogenesis

of prion diseases. Since TEs is an important source of lncRNAs and micro RNAs, an assumption can be made that the individual composition and specific changes of transposons in ontogenesis may be the element triggering the development of TSE and other cerebral proteinopathies including AD, PD and HD all characterized by a structural transformation of specific host proteins into new β-layer-rich conformations.

Conclusion

It has been assumed that interaction of a prion tertiary structure with certain gene sequences of lncRNAs may be one of the mechanisms of prion disease pathogenesis. Such interaction can be similar to the self-regulation of ncRNA by the products of its own translation. It has been found that ncRNAs can be translated, while the peptides formed has a regulatory effect on ncRNA genes. Association of microRNA polymorphism with prion disease development as well as changes in the expression of certain ncRNAs in TSE allow one to assume that specific ncRNAs are able to catalyze PrP^C transformation into a PrP^{Sc} isoform. Therefore, optimal interactions of PrP^{Sc} with the genes of certain RNAs may cause the exponential growth of their amount, if the formed ncRNAs or the subproducts of their interaction are able to catalyze the transformation. MicroRNA activation by prion domains most likely potentiates the formation of microRNAs, whose regulation of the expression of certain genes may also stimulate the conformation transformation. It can also explain the species-specific character of prion infections as well as TSE long incubation period and fast progression. In TSE pathogenesis an important role is given to TEs to be the basis for the neural stem cell differentiation in the hippocampus triggered by TE ncRNAs.

Conflict of interest

The authors claim to have no conflict of interest to declare.

References

- Anderson D.M., Anderson K.M., Cang C.L., Makarewich C.A., Nelson B.R., McAnally J.R., Kasaragod P., Shelton J.M., Liou J., Bassel-Duby R., Olson E.N. A micropeptide encoded by a putative long noncoding RNA regulates muscle performance. *Cell*. 2015;160: 595-606.
- Apra J., Prenninger S., Dori M., Ghosh T., Monasor L.S., Wessendorf E., Zocher S., Massalini S., Alexopoulou D., Lesche M., Dahl A., Groszer M., Hiller M., Calegari F. Transcriptome sequencing during mouse brain development identifies long non-coding RNAs functionally involved in neurogenic commitment. *EMBO J*. 2013;32(24):3145-3160.
- Battistuzzi F.U., Schneider K.A., Spencer M.K., Fisher D., Chaudhry S., Escalante A.A. Profiles of low complexity regions in Apicomplexa. *BMC Evol. Biol.* 2016;16:47. DOI 10.1186/s12862-016-0625-0.

- Bellingham S.A., Coleman B.M., Hill A.F. Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(21):10937-10949.
- Boese A.S., Saba R., Campbell K., Majer A., Medina S., Burton L., Booth T.F., Chong P., Westmacott G., Dutta S.M., Saba J.A., Booth S.A. MicroRNA abundance is altered in synaptoneurosome during prion disease. *Mol. Cell. Neurosci.* 2016;71:13-24.
- Borchert G.M., Holton N.W., Williams J.D., Hernan W.L., Bishop I.P., Dombosky J.A., Elste J.E., Gregoire N.S., Kim J.A., Koehler W.W., Lengerich J.C., Medema A.A., Nguyen M.A., Ower G.D., Rarick M.A., Strong B.N., Tardi N.J., Tasker N.M., Wozniak D.J., Gatto C., Larson E.D. Comprehensive analysis of microRNA genomic loci identifies pervasive repetitive-element origins. *Mob. Genet. Elements.* 2011;1(1):8-17.
- Burak K., Lamoureux L., Boese A., Majer A., Saba R., Niu Y., Frost K., Booth S.A. MicroRNA-16 targets mRNA involved in neurite extension and branching in hippocampal neurons during presymptomatic prion disease. *Neurobiol. Dis.* 2018;112:1-13. DOI 10.1016/j.nbd.2017.12.011.
- Couzigou J.M., Andre O., Cuillotin B., Alexandre M., Combier J.P. Use of microRNA-encoded peptide miPEP172c to stimulate nodulation in soybean. *New Phytol.* 2016;211(2):379-381.
- Couzigou J.M., Lauressergues D., Becard G., Comier J.P. miRNA-encoded peptides (miPEPs): A new tool to analyze the role of miRNAs in plant biology. *RNA Biol.* 2015;12:1178-1180.
- De Cecco E., Legname G. The role of the prion protein in the internalization of α -synuclein amyloids. *Prion.* 2018;12(1):23-27. DOI 10.1080/19336896.2017.1423186.
- Deng B., Cheng X., Li H., Qin J., Tian M., Jin G. Microarray expression profiling in the denervated hippocampus identified long noncoding RNAs functionally involved in neurogenesis. *BMC Mol. Biol.* 2017;18(1):15. DOI 10.1186/s12867-017-0091-2.
- Dwivedi Y. Emerging role of microRNAs in major depressive disorder: diagnosis and therapeutic implications. *Dialogues Clin. Neurosci.* 2014;16(1):43-61.
- Eigenbrod S., Frick P., Bertsch U., Mitteregger-Kretschmar G., Mielke J., Maringer M., Piening N., Hepp A., Daude N., Windl O., Levin J., Giese A., Sakthivelu V., Tatzelt J., Kretschmar H., Westaway D. Substitutions of PrP N-terminal histidine residues modulate scrapie disease pathogenesis and incubation time in transgenic mice. *PLoS ONE.* 2017;12(12):e0188989.
- Evans E.G., Pushie M.J., Markham K.A., Lee H.W., Millhauser G.L. Interaction between prion protein's coopebound octarepeat domain and charged C-terminal pocket suggests a mechanism for N-terminal regulation. *Structure.* 2016;24(7):1057-1067.
- Faulkner G.J. Retrotransposons: mobile and mutagenic from conception to death. *FEBS Lett.* 2011;585(11):1589-1594.
- Fitzgerald K.A., Caffrey D.R. Long noncoding RNAs in innate and adaptive immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 2014;26:140-146.
- Gao C., Shi Q., Wei J., Zhou W., Xiao K., Wang J., Shi Q., Dong X.P. The associations of two SNPs in miRNA-146a and one SNP in ZBTB38-RASA2 with the disease susceptibility and the clinical features of the Chinese patients of sCJD and FFI. *Prion.* 2018;12(1): 34-41. DOI 10.1080/19336896.2017.1405885.
- Gim J., Ha H., Ahn K., Kim D.S., Kim H.S. Genome-wide identification and classification of microRNAs derived from repetitive elements. *Genomics Inform.* 2014;12(4):261-267.
- Gonzalez-Montalban N., Makarava N., Savtchenko R., Baskakov I.V. Relationship between conformational stability and amplification efficiency of prions. *Biochemistry.* 2011;50(37):7933-7940.
- Harbi D., Harrison P.M. Classifying prion and prion-like phenomena. *Prion.* 2014;8(2):pii27960.
- Hennig S., Kong G., Mannen T., Sadowska A., Kobelke S., Blythe A., Knott G.J., Iyer K.S., Ho D., Newcombe E.A., Hosoki K., Goshima N., Kawaguchi T., Hatters D., Trinkle-Mulcahy L., Hirose T., Bond C.S., Fox A.H. Prion-like domains in RNA binding proteins are essential for building subnuclear paraspeckles. *J. Cell. Biol.* 2015;210(4):529-539.
- Johnson R., Guigo R. The RIDL hypothesis: transposable elements as functional domains of long noncoding RNAs. *RNA.* 2014;20(7): 959-976.
- Kyle R.A. Amyloidosis: a convoluted story. *Br. J. Haematol.* 2001;114(3):529-538.
- Lauressergues D., Couzigou J.M., Clemente H.S., Martinez Y., Du-nand C., Becard G., Combier J.P. Primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides. *Nature.* 2015;520(7545):90-93.
- Li Y., Li C., Xia J., Jin Y. Domestication of transposable elements into MicroRNA genes in plants. *PLoS ONE.* 2011;6:e19212.
- Lorenzetti A.P., A de Antonio G.Y., Paschoal A.R., Domingues D.S. Plant TE-MIR DB: a database for transposable element-related microRNAs in plant genomes. *Funct. Integr. Genomics.* 2016;16: 235-242.
- Lu X., Sachs F., Ramsay L., Jacques P.E., Goke J., Bourque G., Ng H.H. The retrovirus HERVH is a long noncoding RNA required for human embryonic stem cell identity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2014; 21(4):423-425.
- Lv S., Pan L., Wang G. Commentary: primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides. *Front. Plant Sci.* 2016;7:1436.
- Mabbott N.A. How do PrP^{Sc} prions spread between host species, and within hosts? *Pathogens.* 2017;6(4). pii: E60. DOI 10.3390/pathogens6040060.
- March Z.M., King O.D., Shorter J. Prion-like domains as epigenetic regulators, scaffolds for subcellular organization, and drivers of neurodegenerative disease. *Brain Res.* 2016;1647:9-18.
- Mercer T.R., Dinger M.E., Sunkin S.M., Mehler M.F., Mattick J.S. Specific expression of long noncoding RNAs in the mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008;105(2):716-721.
- Michelitsch M.D., Weissman J.S. A census of glutamine/asparagines-rich regions: implications for their conserved function and the prediction of novel prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000;97(22): 11910-11915.
- Montag J., Hitt R., Opitz L., Schulz-Schaeffer W.J., Hunsmann G., Motzkus D. Upregulation of miRNA hsa-miR-342-3p in experimental and idiopathic prion disease. *Mol. Neurodegener.* 2009;4:36. DOI 10.1186/1750-1326-4-36.
- Murakami T., Ishiguro N., Haguchi K. Transmission of systemic AA amyloidosis in animals. *Vet. Pathol.* 2014;51(2):363-371.
- Mustafin R.N., Khusnutdinova E.K. Non-coding parts of genomes as the basis of epigenetic heredity. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2017;21(6):742-749. DOI 10.18699/VJ17.30-o. (in Russian)
- Nelson B.R., Makarewicz C.A., Anderson D.M., Winders B.R., Troupes C.D., Wu F., Reese A.L., McAnally J.R., Chen X., Kevalali E.T., Cannon S.C., Houser S.R., Bassel-Duby R., Olson E.N. A peptide encoded by a transcript annotated as long noncoding RNA enhances SERCA activity in muscle. *Science.* 2016;351(6270):271-275.
- Notwell J.H., Chung T., Heavner W., Bejerano G. A family of transposable elements co-opted into developmental enhancers in the mouse neocortex. *Nat. Commun.* 2015;6:6644.

- Richardson S.R., Morell S., Faulkner G.J. L1 retrotransposons and somatic mosaicism in the brain. *Annu. Rev. Genet.* 2014;48:1-27.
- Rubenstein R., Wang K.K., Chiu A., Grinkina N., Sharma D.R., Agarwal S., Lin F., Yang Z. PrPC expression and calpain activity independently mediate the effects of closed head injury in mice. *Behav. Brain Res.* 2018;340:29-40.
- Ruiz-Orera J., Messegue X., Subirana J.A., Alba M.M. Long non-coding RNAs as a source of new peptides. *Elife.* 2014;3:e03523. DOI 10.7554/eLife.03523.
- Saa P., Sferrazza G.F., Ottenberg G., Oelschlegel A.M., Dorsey K., Lasmezas C.I. Strain-specific role of RNAs in prion replication. *J. Virol.* 2012;86(19):10494-10504.
- Saba R., Goodman C.D., Huzarewich R.L., Robertson C., Booth S.A. A miRNA signature of prion induced neurodegeneration. *PLoS ONE.* 2008;3:e3652.
- Saba R., Gushue S., Huzarewich R.L., Manguiat K., Medina S., Robertson C., Booth S.A. MicroRNA 146a (miR-146a) is over-expressed during prion disease and modulates the innate immune response and the microglial activation state. *PLoS ONE.* 2012;7(2):e30832.
- Saba R., Medina S.J., Booth S.A. A functional SNP catalog of overlapping miRNA-binding sites in genes implicated in prion disease and other neurodegenerative disorders. *Hum. Mutat.* 2014;35(10):1233-1248.
- Saghatelian A., Couso J.P. Discovery and characterization of smORF encoded bioactive polypeptides. *Nat. Chem. Biol.* 2015;11(12):909-916.
- Sanz Rubio D., Lopez-Perez O., de Andres Pablo A., Bolea R., Osta R., Badiola J.J., Zaragoza P., Martin-Burriel I., Toivonen J.M. Increased circulating microRNAs miR-342-3p and miR-21-5p in natural sheep prion disease. *J. Gen. Virol.* 2017;98(2):305-310.
- Simoneau S., Thomzig A., Ruchoux M.M., Vignier N., Daus M.L., Poleggi A., Lebon P., Freire S., Durand V., Graziano S., Galeno R., Cardone F., Comoy E., Pocchiari M., Beekes M., Deslys J.P., Fournier J.G. Synthetic scrapie infectivity: interaction between recombinant PrP and scrapie brain-derived RNA. *Virulence.* 2015;6(2):132-144. DOI 10.4161/21505594.2014.989795.
- Tetz G., Tetz V. Prion-like domains in phagobiota. *Front. Microbiol.* 2017;8:2239.
- Timmes A.G., Moore R.A., Fischer E.R., Priora S.A. Recombinant prion refolded with lipid and RNA has the biochemical hallmarks of a prion but lacks in vivo infectivity. *PLoS ONE.* 2013;8(7):e71081.
- Tycko R. Physical and structural basis for polymorphism in amyloid fibrils. *Protein Sci.* 2014;23(11):1528-1539.
- Upton K.R., Gerhardt D.J., Jesuadian J.S., Richardson S.R., Sanchez-Luque F.J., Bodea G.O., Ewing A.D., Salvador-Palomegue C., van der Knaap M.S., Brennan P.M., Vanderver A., Faulkner G.J. Ubiquitous L1 mosaicism in hippocampal neurons. *Cell.* 2015;161(2): 228-239.
- Wang J., Li X., Wang L., Li J., Zhao Y., Bou G., Li Y., Jiao G., Shen X., Wei R., Liu S., Xie B., Lei L., Li W., Zhou Q., Liu Z. A novel long intergenic noncoding RNA indispensable for the cleavage of mouse two-cell embryos. *EMBO Rep.* 2016;17:1452-1470.
- Zhang J., Mujahid H., Hou Y., Nallamilli B.R., Peng Z. Plant long ncRNAs: a new frontier for gene regulatory control. *Am. J. Plant Sci.* 2013;4(5):1038-1045. DOI 10.4236/ajps.2013.45128.



RNAi-mediated silencing of matrix metalloproteinase 1 in epidermal keratinocytes influences the biological effects of interleukin 17A

J.A. Mogulevtseva¹, A.V. Mezentshev²✉, S.A. Bruskin²

¹ Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia

² N.I. Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow, Russia

Matrix metalloproteinases (MMPs) are important for the pathogenesis of psoriasis and other autoimmune disorders. In the extracellular matrix, accumulation of proinflammatory cytokines, such as interleukin 17A (IL-17A), leads to induction of several MMPs, including MMP1. MMPs change the composition and other properties of the extracellular matrix. These changes facilitate tissue remodeling and promote the development of psoriatic plaques. The aim of this study was to explore how MMP1 silencing might influence the biological effects of IL-17A on migration and proliferation of human epidermal keratinocytes and the expression of genes involved in their division and differentiation. The experiments were performed with MMP1-deficient and control epidermal keratinocytes, HaCaT-MMP1 and HaCaT-KTR, respectively. Cell proliferation and migration were assessed by comparative analysis of the growth curves and scratch assay, respectively. To quantify cell migration, representative areas of cell cultures were photographed at the indicated time points and compared to each other. Changes in gene expression were analyzed by real-time PCR. The obtained results demonstrated that MMP1 silencing in the cells treated with IL-17A resulted in downregulation of MMP9 and -12, *FOSL1*, *CCNA2*, *IVL*, *KRT14* and -17 as well as upregulation of *MMP2*, *CCND1* and *LOR*. Moreover, MMP1 silencing led to a decrease in cell proliferation and an impairment of cell migration. Thus, MMP1-deficiency in epidermal keratinocytes can be beneficial for psoriasis patients that experience an accumulation of IL-17 in lesional skin. Knocking *MMP1* down could influence migration and proliferation of epidermal keratinocytes *in vivo*, as well as help to control the expression of *MMP1*, -2, -9 и -12, *CCNA2*, *CCND1*, *KRT14* and -17 that are crucial for the pathogenesis of psoriasis.

Key words: matrix metalloproteinase 1; psoriasis; interleukin 17; small hairpin RNA; gene silencing.

Особенности протекания РНК-интерференции матриксной металлопротеиназы 1 в эпидермальных кератиноцитах, обработанных интерлейкином 17A

Ю.А. Могулевцева¹, А.В. Мезенцев²✉, С.А. Брускин²

¹ Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, Россия

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

Матриксные металлопротеиназы (ММП) играют важную роль в патогенезе псориаза, а также ряда других аутоиммунных заболеваний. Накопление интерлейкина 17A (ИЛ-17A) и других провоспалительных цитокинов в межклеточном матриксе приводит к индукции генов некоторых матриксных металлопротеиназ, в частности *MMP1*. Рост протеолитической активности в межклеточном матриксе меняет его состав и свойства, а также способствует структурной реорганизации пораженного болезнью участка кожи. Структурная реорганизация, в свою очередь, приводит к изменению внешнего облика кожных покровов и образованию псориазических бляшек. Целью данной работы было исследовать влияние РНК-интерференции *MMP1* на биологические эффекты ИЛ-17A, такие как способность данного цитокина стимулировать миграцию и пролиферацию эпидермальных кератиноцитов человека, а также регулировать экспрессию генов, которые играют важную роль в процессе дифференцировки данного типа клеток. В работе использовали иммортализованные эпидермальные кератиноциты с «нокдауном» *MMP1* и без него – HaCaT-MMP1 и HaCaT-KTR соответственно. Для оценки пролиферации клеток сопоставляли кривые их роста. Миграцию клеток оценивали путем сравнения репрезентативных фотографических изображений, которые были получены через равные промежутки времени. Изменения в экспрессии генов анализировали методом ПЦР в режиме реального времени. Согласно полученным результатам, в клетках, обработанных ИЛ-17A, РНК-интерференция *MMP1* приводит к уменьшению экспрессии *MMP9* и *MMP12*, *FOSL1*, *CCNA2*, *IVL*, *KRT14* и *KRT17*, а также к увеличению экспрессии *MMP2*, *CCND1* и *LOR*. «Нокдаун» *MMP1* замедляет процесс миграции клеток и приводит к снижению скорости их пролиферации. Таким образом, проведенное нами

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Mogulevtseva J.A., Mezentshev A.V., Bruskin S.A. RNAi-mediated silencing of matrix metalloproteinase 1 in epidermal keratinocytes influences the biological effects of interleukin 17A. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(4):425-432. DOI 10.18699/VJ18.378

Received 22.11.2017

Accepted for publication 05.02.2018

© AUTHORS, 2018



e-mail: mesentsev@vigg.ru

исследование показало, что в присутствии ИЛ-17А РНК-интерференция *MMP1* обладает потенциальным терапевтическим эффектом, который может быть использован при лечении псориаза. «Нокдаун» ММР1 позволяет воздействовать на пролиферацию и миграцию клеток, а также контролировать экспрессию важных для патогенеза болезни генов (*MMP1*, *MMP2*, *MMP9* и *MMP12*, *CCNA2*, *CCND1*, *KRT14* и *KRT17*).

Ключевые слова: матриксная металлопротеиназа 1; псориаз; интерлейкин 17; малая ингибирующая РНК; РНК-интерференция.

Plaque psoriasis (psoriasis vulgaris) is one of the most abundant chronic non-infectious skin conditions (Greb et al., 2016). According to the World Health Organization, the prevalence of psoriasis worldwide is ~3% (Michalek et al., 2017). In mainland Russia, the prevalence of psoriasis is ~1.9% (Khamaganova et al., 2015). The most distinctive hallmark of psoriasis is the appearance of thick scaly plaques on the patient's skin. In 21.1% and 5.7% of cases, respectively, the disease targets nails and joints (Rukavishnikova, 2009; Mishina et al., 2013). Moreover, psoriasis is often accompanied by comorbidities, such as cardiovascular disease, type II diabetes and atherosclerosis (Batyrshtina, Sadykova, 2014).

At the molecular level, the development of psoriatic plaques leads to differential expression of thousands of genes (Zolotarev et al., 2016), including the genes involved in proliferation and the terminal differentiation of epidermal keratinocytes. In lesional skin, *KRT1*, *KRT5* and *KRT10* are downregulated (Rao et al., 1996; Jin, Wang, 2014), whereas *KRT14*, *KRT16*, and *KRT17* are upregulated (Al Robaee, 2010; Jin, Wang, 2014). The late differentiation markers loricrin (*LOR*) and filaggrin (*FLG*) are expressed there at a lower level. In contrast, the expression level of the early differentiation marker involucrin (*IVL*) is higher (Soboleva et al., 2014a). The proliferation marker *MKI67* (Yazici et al., 2005) and cyclin A2 (Manczinger, Kemény, 2013) are upregulated, while cyclin D1 is downregulated (Reischl et al., 2007).

The proinflammatory cytokine interleukin 17A (IL-17A) plays a key role in the pathogenesis of psoriasis. Specifically, IL-17A contributes to the inflammatory response by inducing the chemokines *CCL20*, *CXCL1*, *CXCL2*, and *CXCL8*. Their secretion to the extracellular matrix promotes the migration of activated immune cells to lesional epidermis. In turn, the accumulation of immune cells in lesional skin stabilizes there the inflammatory process (Seo et al., 2017).

This concept fits well with emerging results from clinical trials with IL-17A-specific antibodies (Canavan et al., 2016). According to the clinical data, ~85–90% of patients with moderate and severe psoriasis achieve PASI₇₅ after completion of the therapy. Moreover, the tested IL-17A-specific antibodies exhibit low immunogenicity. On the other hand, these medicines affect the patients' ability to respond to pathogens. In addition, people who experience allergic reactions or were diagnosed with Chron's disease and ulcerative colitis are advised from taking injections of IL-17A-specific antibodies. In this respect, an approval of IL-17A-specific antibodies for use in clinical practice does not diminish further efforts to find

safer and even more efficient treatment options for psoriasis, such as a modulation of gene expression with specific shRNA.

In the lab, our research is focused on matrix metalloproteinases, such as matrix metalloproteinase 1 (MMP1), and their role in psoriasis. Previously, we demonstrated that changes of *MMP1*, *MMP9* and *MMP12* expression levels coincide with flaring of the disease and correlate with the disease severity (Starodubtseva et al., 2011). In this paper, we are exploring how *MMP1* silencing with specific shRNA might influence migration and proliferation of epidermal keratinocytes treated with IL-17A. We also wanted to reveal whether knocking *MMP1* down affected the expression of genes involved in the pathogenesis of psoriasis.

Materials and methods

Cell culturing. The experiments were performed with MMP1-deficient and control immortalized epidermal keratinocytes, HaCaT-MMP1 and HaCaT-KTR, respectively. The mentioned cell lines were obtained as described previously (Mogulevtseva, Mezentshev, 2017). The cells were cultured in DMEM medium, supplemented with 5% embryonic calf serum, L-glutamine (PanEco, Russia) and antibiotic-antimycotic (ThermoFisher Scientific, USA). The medium was replaced every other day. Once the cells reached 70–75% confluence, they were seeded into new dishes at a ratio of 1:5. The cells were counted with a hemocytometer.

Preparation of total RNA. The total RNA was purified with TRIZOL (ThermoFisher Scientific) as described previously (Chomczynski, Mackey, 1995). Purity and integrity of the obtained RNA were verified using non-denaturing 1.5% agarose gel electrophoresis. A Qubit RNA BR Assay Kit (ThermoFisher Scientific) was used to quantify RNA according to the manufacturer's protocol.

Real-time PCR. Before the experiment, RNA was converted to cDNA using an MMLV RT kit (Evrogen, Russia). The experiments were carried out in the Eco real-time PCR system (Illumina, USA) according to the instructions supplied by the manufacturer. The primers used in this study were taken from the NCBI Probe database (NCBI Probe, 2015). The *ACTB* assay was used as an endogenous control. The results were analyzed using preinstalled software supplied by the manufacturer. Each probe was run in triplicates. Overall, three independent experiments were performed.

Proliferation assay. To assess the cell proliferation rate, cells were plated at 40,000 cells/well in 6-well plates. To obtain cell suspensions, randomly chosen samples were treated with 0.25% trypsin-EDTA (PanEco) on a daily basis. The cell

suspensions were stained with 0.2 % trypan blue and counted with a hemocytometer. Then, the cell counts were plotted against the incubation time to generate the growth curves in linear coordinates. To assess changes in cell proliferation rates, the data were represented in semilogarithmic coordinates and subjected to linear regression analysis. Slopes of these lines served us as the estimates of the cell proliferation rates. Overall, three independent experiments were performed.

Scratch assay. To assess cell migration, the designated cell lines were cultured until confluence. The cell monolayer was scratched with a pipette tip to form a 1.25 mm-wide cell-free area across the center of the well. Then, the remaining cells were cultured for 5–6 days and the most representative cell-free areas were photographed on a daily basis. These areas were quantified using the “Freehand selection” tool of “ImageJ” freeware (Schindelin et al., 2015).

Statistical analysis. The data obtained were represented as the mean $\pm$ standard error ($m \pm SE$). The statistical differences between the means were assessed by a one-way analysis of variances. If p values were less than 0.05, the means were considered to be significantly different.

Results

Influence of *MMP1* silencing on gene expression

Culturing HaCaT-KTR and HaCaT-MMP1 cells in the presence of IL-17A resulted in a differential expression of matrix metalloproteinases, cytokeratin, proliferation

markers and terminal differentiation markers of epidermal keratinocytes (Fig. 1).

Particularly, the exposure of HaCaT-KTR cells to IL-17A led to upregulation of *MMP9* and *MMP12* (11.15 ± 1.67 and 7.58 ± 1.14 , respectively) and downregulation of *MMP2* (0.37 ± 0.05). In the same time, their expression levels in HaCaT-MMP1 cells were 2.29 ± 0.34 , 2.44 ± 0.37 and 0.98 ± 0.15 , respectively (Fig. 1, *a*). Moreover, *MMP1* expression in MMP1-deficient cells remained relatively low (0.28 ± 0.04), despite the cells were exposed to a high concentration of IL-17A.

The expression of the cell proliferation marker *MKI67* was increased in both cell lines (3.80 ± 0.57 in HaCaT-KTR cells and 5.66 ± 0.85 in HaCaT-MMP1 cells, $p = 0.36$). In contrast, cyclins *CCNA2* and *CCND1* were downregulated (Fig. 1, *b*). Particularly, *CCNA2* expression levels were 0.32 ± 0.05 in HaCaT-KTR cells and 0.13 ± 0.02 in HaCaT-MMP1 cells, while *CCND1* expression levels were 0.13 ± 0.02 and 0.71 ± 0.11 , respectively.

Moreover, we observed slight changes in the expression levels of the terminal differentiation markers in HaCaT-KTR cells. Particularly, the expression levels of *IVL*, *LOR* and *FLG* were 1.44 ± 0.13 , 1.15 ± 0.11 and 1.26 ± 0.27 , respectively (Fig. 1, *c*), whereas the expression levels of the mentioned genes in HaCaT-MMP1 cells were 1.01 ± 0.11 (*IVL*), 1.79 ± 0.17 (*LOR*) and 1.89 ± 0.14 (*FLG*). In HaCaT-KTR cells, the expression levels of cytokeratin did not exceed 1.5 compared to the negative control, except *KRT14* and *KRT17*, which were upregulated (1.86 ± 0.14

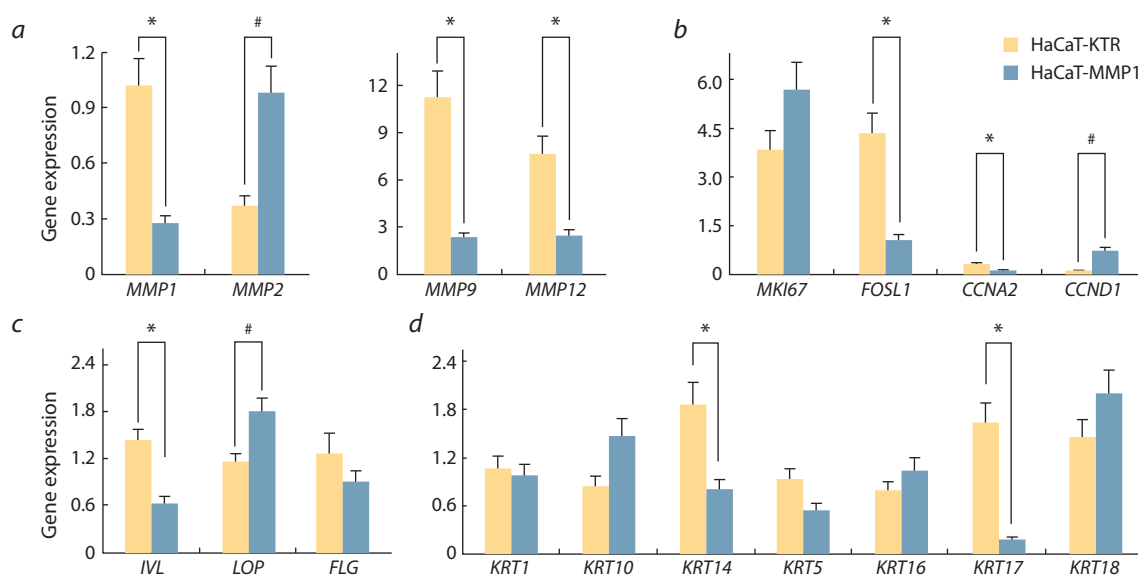


Fig. 1. qPCR analysis of gene expression in human epidermal keratinocytes HaCaT-MMP1 and HaCaT-KTR treated with IL-17A. The data presented in the figure describe changes in the expression of matrix metalloproteinases (*a*), proliferation markers (*b*), terminal differentiation markers of epidermal keratinocytes (*c*) and cytokeratin (*d*).

The cells were treated with 50 ng/mL IL-17A. In the probes, the measurements were normalized to the level of *ACTB*. The gene expression levels in untreated HaCaT-KTR cells were considered equal to 1. The symbols ‘#’ and ‘*’ were used to mark the genes whose expression levels were significantly higher and lower, respectively, in HaCaT-MMP1 than in HaCaT-KTR ($p < 0.05$, $n = 3$).

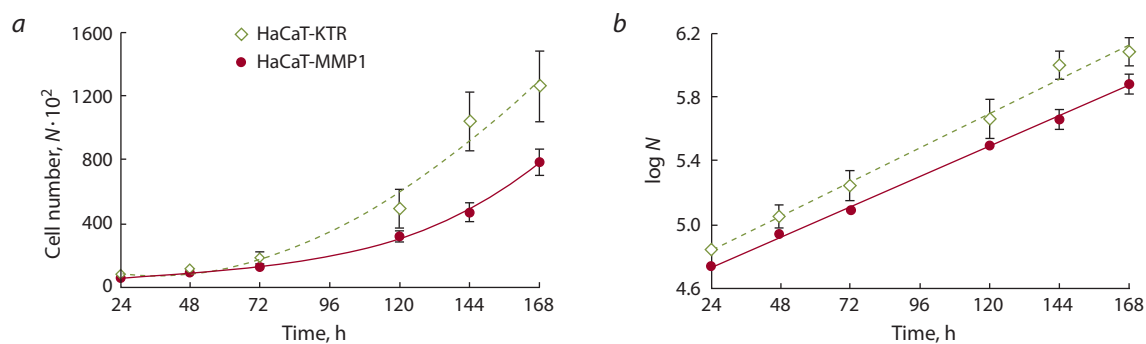


Fig. 2. Influence of MMP1 silencing on the proliferation of HaCaT-KTR and HaCaT-MMP1 cells treated with IL-17A. Experimental curves that reflected the cell growth in real time were plotted in linear (a) and semilogarithmic (b) coordinates. HaCaT-MMP1 and HaCaT-KTR cells were treated with 50 ng/mL IL-17A for the indicated periods of time.

Details on cell culturing are provided in the section “Materials and methods”.

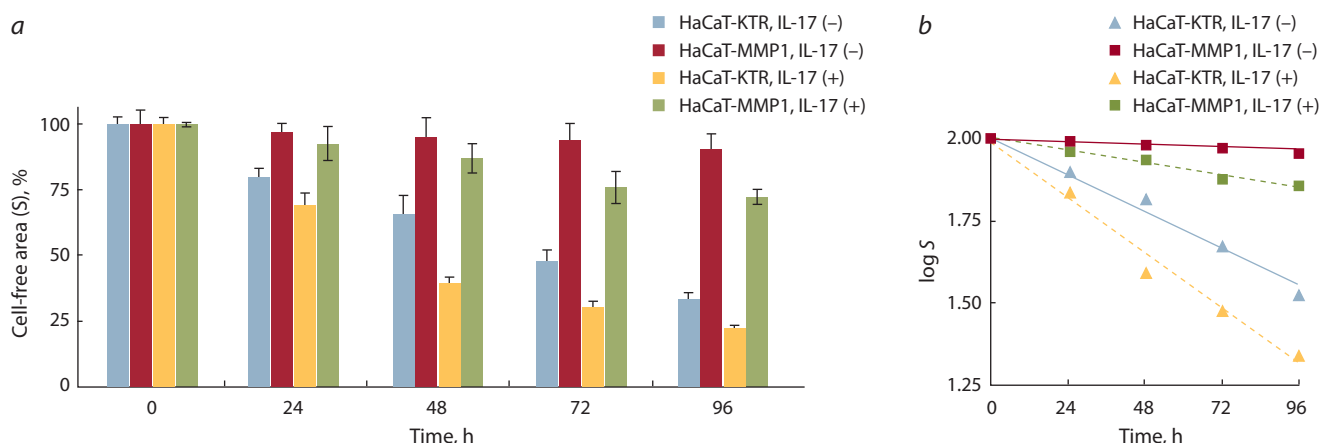


Fig. 3. Influence of MMP1 silencing on migration of human epidermal keratinocytes treated with IL-17A. In the figure, the obtained experimental data were represented in linear (a) and semilogarithmic (b) coordinates.

The cells were exposed to IL-17A (50 ng/mL) for the indicated periods of time, as described in the section “Materials and methods”.

and 1.64 ± 1.15 , respectively). In contrast, *KRT17* was significantly downregulated in HaCaT-MMP1 (0.19 ± 0.02) compared to HaCaT-KTR cells.

Influence of MMP1 silencing on cell proliferation

Comparative analysis of the growth curves revealed that HaCaT-MMP1 and HaCaT-KTR cells remained in the active growth phase for the time of the experiment (Fig. 2). The time-dependences of cell growth in linear coordinates (Fig. 2, a) suggested that the cells grew monotonously, i.e. for the time of observation, the growth curves did not reach saturation. At the same time, a semilog transformation of the growth curves (Fig. 2, b) revealed a high correlation between time and cell numbers ($r > 0.99$; $p < 0.001$). Furthermore, *MMP1* silencing caused a delay in cell growth (Fig. 2, a). According to the results of linear regression, the proliferation rates of HaCaT-KTR and HaCaT-MMP1 cells were 0.0090 ± 0.0003 and 0.0078 ± 0.0003 , respectively.

Influence of MMP1 silencing on cell migration

Analysis of cell migration showed that the motility of HaCaT-MMP1 was significantly impaired compared to HaCaT-KTR

cells (Fig. 3, a). In contrast, exposure of both cell lines to IL-17A stimulated cell migration. In this respect, *MMP1*-deficiency resulted in an 11.48-fold decrease of the migration constant, whereas exposure of HaCaT-KTR and HaCaT-MMP1 cells to IL-17A caused 1.43- and 3.63-fold increases of the corresponding migration constants (Fig. 3, b).

Discussion

IL-17A is one of proinflammatory cytokines that are implicated in the pathogenesis of various autoimmune diseases including psoriasis (Korotaeva, 2016). In psoriasis, IL-17A is accumulated in lesional skin. After secretion by T-helper 17 (T_{H17}) immune cells into the extracellular matrix, IL-17A activates the IL-17RA receptor, which is located in the plasma membrane of immunocytes, such as macrophages, and resident skin cells primarily keratinocytes, dendritic cells and fibroblasts. The interaction of IL-17A with IL-17RA results in the induction of various proinflammatory cytokines (TNF, IL-1 β , and IL-6, etc.) and chemokines (IL-8, CXCL1, CXCL2 and CCL20) (Mills, 2008; Seo et al., 2017). The induced cytokines influence proliferation and differentiation of epidermal keratinocytes, whereas chemokines promote the

migration of immune cells, such as neutrophils and monocytes to the skin. The former causes the development of psoriatic plaques. The latter stabilizes the inflammatory response in psoriatic plaques.

The concentration of IL-17A in the blood serum of healthy volunteers usually does not exceed 10 pg/mL (Shilova et al., 2015). In contrast, the biological effects of IL-17A in cultured epidermal keratinocytes and fibroblasts, such as activation of protein kinases (Peric et al., 2008, 2009), induction of proinflammatory cytokines (Tohyama et al., 2009; Cho et al., 2012) or influencing cell proliferation (Ma, Jia, 2016) require an incubation of cells in the presence of 10–100 ng/mL IL-17A. Presumably, this difference can be explained by the fact that in psoriasis, T_{H17} cells, which are the main source of IL-17A in the body, are predominantly located in the inflamed tissue where they are needed to stabilize the inflammatory response. For this reason, we treated epidermal keratinocytes with 50 ng/mL IL-17A (Starodubtseva et al., 2011).

Culturing HaCaT-KTR and HaCaT-MMP1 cells in the presence of IL-17A, we anticipated that the genes involved in the terminal differentiation and proliferation of epidermal keratinocytes would be differentially expressed. Primarily, we expected to see changes in gene expression similar to ones that occur during the development of psoriatic plaques. In this respect, changes in the expression of *IVL*, *MKI67*, *KRT14* and *KRT17* that we observed in HaCaT-KTR cells, i.e. the cell line that expressed scrambled shRNA, did not surprise us (see Fig. 1). We also wanted to explore how *MMP1* silencing could influence the expression of genes that were implicated in the pathogenesis of psoriasis. Notably, upregulation of *MKI67*, *MMP9* and *MMP12* as well as downregulation of *CCNA2* and *CCND1* occur in both cell lines, i.e. it is unlikely that they are caused by *MMP1*-silencing (see Fig. 1, *a* and *b*). In the same time, lower expression levels of *MMP9* and *MMP12* as well as a higher expression level of *MMP2* in HaCaT-MMP1 suggest that the expression of *MMP1*-specific shRNA could help to control MMPs expression in lesional psoriatic skin (Nair et al., 2009). Moreover, changes in the expression of the terminal differentiation markers, such as downregulation of *IVL* ($p = 0.05$) and upregulation of *LOR* ($p = 0.03$) in HaCaT-MMP1 cells (see Fig. 1, *c*) are also opposite to ones that occur in lesional psoriatic skin. However, we did not discover significant differences in *FLG* expression between HaCaT-MMP1 and HaCaT-KTR ($p = 0.29$).

Notably, exposure of both cell lines to IL-17A does not cause significant changes in the expression of many cytokeratins (see Fig. 1, *d*). This can be explained by the fact that HaCaT cells, i.e. the cell line that was used to generate HaCaT-KTR and HaCaT-MMP1 cells, and primary epidermal keratinocytes react differentially to treatment with IL-17A. Particularly, culturing the primary cells in the presence of 50 ng/mL IL-17A results in downregulation of *KRT10*, *FLG*, *LOR* and *IVL* (Noh et al., 2010), whereas treatment of HaCaT with the same concentration of IL-17A does not cause any significant changes in the expression of the named genes (Seo et al., 2012). In contrast, we report here that the incubation of HaCaT-KTR cells with IL-17A results in upregulation of *KRT14* and *KRT17*. These changes in gene expression are similar to ones that occur in lesional psoriatic skin (Nair et al., 2009). However, it is even more

important that *MMP1* silencing downregulates both genes. For instance, it results in more than a 10-fold downregulation of *KRT17*. In the published papers, *KRT17* is often referred to as a “key gene” of psoriasis (Al Robaee, 2010; Jin, Wang, 2014). Suppression of *KRT17* in the skin of lab animals prevents hyperplasia, i.e. thickening of the epidermis due to more intensive cell division and lowering the intensity of the inflammatory process. In contrast, induction of *KRT17* stimulates the secretion of T_{H1} chemokines, such as CXCL5, CXCL9, CXCL10 and CXCL11 (Al Robaee, 2010). In this respect, we assume that *MMP1* silencing could be beneficial for psoriasis patients to attenuate the inflammatory response and suppress hyperplasia in lesional psoriatic skin.

Comparative analysis of gene expression in HaCaT-MMP1 and HaCaT-KTR cells treated with IL-17A reveals that HaCaT-MMP1 cells express less *CCNA2* and more *CCND1* (see Fig. 1, *b*). However, differences in the expression of the proliferation marker *MKI67* between these two cell lines are insignificant ($p = 0.36$). According to the previously published data, *CCND1* is required for the transition from G_1 -phase of the cell cycle to S-phase, whereas *CCNA2* is needed for the transition from G_2 -phase to M-phase (Matsushima et al., 1992; Pagano et al., 1992). Furthermore, the changes in the expression of *CCND1* and *CCNA2* that the others observe in psoriatic lesional skin are opposite to the ones we see in *MMP1*-deficient cells. Particularly, comparative analysis of skin samples obtained from lesional and uninvolved skin reveals a two-fold decrease for *CCND1* (Reischl et al., 2007) and an 8.7-fold increase for *CCNA2* (Manczinger, Kemény, 2013) in lesional skin. This shift in the cytokine balance is also in line with the results of our cell proliferation assay (see Fig. 2). According to the obtained data, HaCaT-MMP1 cells exhibit a 1.15-fold decrease in the constant of proliferation compared to HaCaT-KTR cells. At the same time, IL-17A does not stimulate proliferation of HaCaT cells *in vitro* (Soboleva et al., 2014b). Hence, we propose that *MMP1* silencing could also exert an antiproliferative effect in lesional psoriatic skin that accumulates IL-17A.

Moreover, culturing HaCaT-KTR cells in the presence of IL-17A results in differential expression of the matrix metalloproteinases (see Fig. 1, *a*) *MMP2* (0.37 ± 0.05), *MMP9* (11.15 ± 1.67) and *MMP12* (7.58 ± 1.14). To the reference, similar changes in the expression of the named metalloproteinases occur in lesional psoriatic skin. For instance, one of the previous studies performed in our lab revealed that in lesional psoriatic skin, *MMP2* was downregulated (0.77 ± 0.23), whereas *MMP9* and *MMP12* were upregulated (4.2 ± 0.65 -fold and 17.25 ± 5.80 -fold, respectively) compared to uninvolved skin (Starodubtseva et al., 2011). In this study, we show that *MMP2*, *MMP9* and *MMP12* expression levels in *MMP1*-deficient cells (0.98 ± 0.15 , 2.29 ± 0.34 and 2.44 ± 0.37 , respectively) are comparable to the negative control, i.e. HaCaT-KTR, untreated with IL-17A. In this respect, the obtained results suggest that *MMP1* silencing could be used *in vivo* to control the expression of the mentioned matrix metalloproteinases, primarily *MMP9* and *MMP12*.

In this paper, we also report that IL-17A stimulates migration of both HaCaT-KTR and HaCaT-MMP1 cells (see Fig. 3). According to the published data, IL-17A promotes the

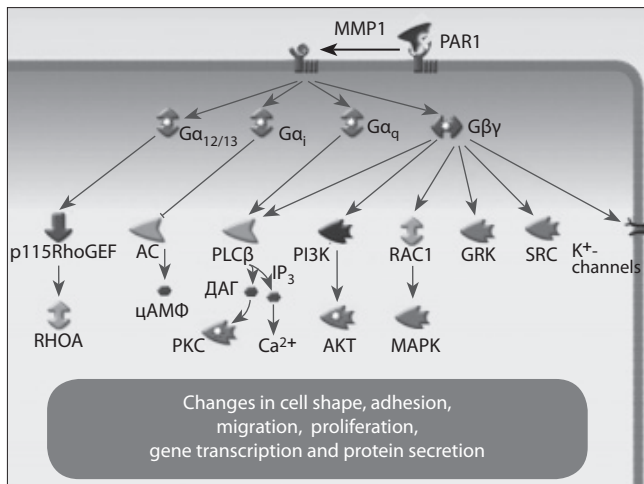


Fig. 4. The proposed intracellular signalling mechanisms underlying MMP1-induced activation of the PAR1 receptor.

The following molecules participating in MMP1-induced activation of PAR1 are located downstream of G-coupled proteins. The proteins: p115RhoGEF, RHO guanine nucleotide exchange factor 1; AC, adenylyl cyclase; PLCβ, β isoform of phospholipase C; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; RAC1, ras-related C3 botulinum toxin substrate 1; GRK, G protein-coupled receptor kinase; SRC, proto-oncogene c-SRC; RHOA, RAS homologue gene family, member A; PKC, protein kinase C; AKT, AKT kinase or protein kinase B; and MAPKs, mitogen-activated protein kinases. The selected products of their catalytic activity: DAG, diacylglycerol; IP₃, inositol trisphosphate; and cAMP, cyclic adenosine monophosphate.

migration of fibroblasts (Wu et al., 2014) and blood vessel endothelial cells (Vegfors et al., 2016). However, the influence of IL-17A on migration of epidermal keratinocytes was not previously reported. As it was previously discussed, the mobility of epidermal keratinocytes depends on the expression levels of matrix metalloproteinases, primarily *MMP1*, *MMP3*, *MMP9*, and *MMP13* (Mezentsev et al., 2014). Moreover, it can be increased by treatment of the cells with tumor necrosis factor (TNF) due to the ability of TNF to induce *MMP9* (Scott et al., 2004). The authors of the cited paper report that TNF induces cell migration in a dose-dependent manner. Moreover, treatment of the cells with antibodies specific to either *MMP9* or TNF significantly slows the migration down. In turn, we report that culturing the cells in the presence of IL-17A induces *MMP9* and *MMP12*. According to our data, HaCaT-KTR cells where *MMP9* is induced gain a higher motility, compared to HaCaT-MMP1 cells where *MMP9* is downregulated (see Fig. 1, a).

In conclusion, we would like to acknowledge that the results of this study suggest reconsidering the traditional role of MMP1 as a proteolytic enzyme. Obviously, the influence of *MMP1* silencing on the expression of cyclins and cytokeratins as well as the negative effect on cells proliferation can be explained by the direct participation of this enzyme in intracellular signalling pathways. First, this is possible due to some products of the MMP1-catalyzed reaction known as matrikins mediate the signalling mechanisms (Wells et al., 2015). Secondly, some matrix metalloproteinases, such as MMP1, directly interact with PAR receptors (Boire et al., 2005). Following the binding to the G-protein coupled PAR1 receptor (Fig. 4), MMP1 cuts N-terminal peptide. Then, this

peptide binds to the receptor as a ligand and they form an active ligand-receptor complex. On the cytoplasmic side of the cell membrane, the complex interacts with one of G-proteins (Gα_{12/13}, Gα_i, Gα_q и Gβγ). Each of these proteins activates a unique pattern of signalling pathways that may result in a different outcome for the cell. Although the factors that influence the interaction of PAR receptors with particular G-proteins still need to be studied, activation of the same receptor in different physiological conditions may cause a shape change, changes in cell behavior, induction of certain genes or activation of protein secretion. Importantly, similar changes are also observed in the pathogenesis of psoriasis. As we believe, the key findings of this paper open an opportunity for the creation of a new therapeutic approach that can be used for psoriasis. In this respect, we would like to mention that new recombinant viruses were proposed to deliver the desired genes to the diseased organs and tissues and several therapeutic approaches were proposed to treat human genetic disorders (Hacein-Bey-Abina et al., 2002; Bainbridge et al., 2008). Moreover, viral transfection was successfully used to treat psoriasis in humanized animals (Jakobsen et al., 2009).

Acknowledgments

The authors are grateful to Prof. E.S. Piruzian for critical analysis of the manuscript and fruitful discussion of the obtained results.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Al Robae A.A. Molecular genetics of Psoriasis (Principles, technology, gene location, genetic polymorphism and gene expression). Int. J. Health Sci. (Qassim). 2010;4(2):103-127.
- Bainbridge J.W., Smith A.J., Barker S.S., Robbie S., Henderson R., Balaggan K., Viswanathan A., Holder G.E., Stockman A., Tyler N., Petersen-Jones S., Bhattacharya S.S., Thrasher A.J., Fitzke F.W., Carter B.J., Rubin G.S., Moore A.T., Ali R.R. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. N. Engl. J. Med. 2008;358(21):2231-2239. DOI 10.1056/NEJMoa0802268.
- Batyrrshina S.V., Sadykova F.G. Comorbid conditions in patients with psoriasis. Prakticheskaya Meditsina = Practical Medicine. 2014;8:32-35. (in Russian)
- Boire A., Covic L., Agarwal A., Jacques S., Sherifi S., Kuliopulos A. PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. Cell. 2005;120(3):303-313. DOI 10.1016/j.cell.2004.12.018.
- Canavan T.N., Elmetts C.A., Cantrell W.L., Evans J.M., Elewski B.E. Anti-IL-17 medications used in the treatment of plaque psoriasis and psoriatic arthritis: a comprehensive review. Am. J. Clin. Dermatol. 2016;17(1):33-47. DOI 10.1007/s40257-015-0162-4.
- Cho K.A., Suh J.W., Lee K.H., Kang J.L., Woo S.Y. IL-17 and IL-22 enhance skin inflammation by stimulating the secretion of IL-1β by keratinocytes via the ROS-NLRP3-caspase-1 pathway. Int. Immunol. 2012;24(3):147-158. DOI 10.1093/intimm/dxr110.
- Chomczynski P., Mackey K. Short technical reports. Modification of the TRI reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide and proteoglycan-rich sources. BioTechniques. 1995;19(6):942-945.
- Goldminz A.M., Elder J.T., Lebwohl M.G., Gladman D.D., Wu J.J., Mehta N.N., Finlay A.Y., Gottlieb A.B. Psoriasis. Nat. Rev. Dis.

- Primers. 2016;2:16082. DOI 10.1038/nrdp.2016.82.
- Hacein-Bey-Abina S., Le Deist F., Carlier F., Bouneaud C., Hue C., De Villartay J.P., Thrasher A.J., Wulffraat N., Sorensen R., Dupuis-Girod S., Fischer A., Davies E.G., Kuis W., Leiva L., Cavazzana-Calvo M. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N. Engl. J. Med.* 2002;346(16): 1185-1193. DOI 10.1056/NEJMoa012616.
- Jakobsen M., Stenderup K., Rosada C., Moldt B., Kamp S., Dam T.N., Jensen T.G., Mikkelsen J.G. Amelioration of psoriasis by anti-TNF- α RNAi in the xenograft transplantation model. *Mol. Ther.* 2009;17(10):1743-1753. DOI 10.1038/mt.2009.141.
- Jin L., Wang G. Keratin 17: a critical player in the pathogenesis of psoriasis. *Med. Res. Rev.* 2014;34(2):438-454. DOI 10.1002/med.21291.
- Khamaganova I.V., Almazova A.A., Lebedeva G.A., Ermachenko A.V. Psoriasis epidemiology issues. *Klinicheskaya Dermatologiya i Venerologiya = Russian Journal of Dermatology and Venereology.* 2015;1:12-16. DOI 10.17116/klinderma2015112-16. (in Russian)
- Korotaeva T.V. Prospects for using interleukin-17 inhibitors, a new class of drugs for targeted therapy of psoriatic arthritis. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice.* 2016;54(3):346-351. DOI 10.14412/1995-4484-2016-346-351. (in Russian)
- Ma W.Y., Jia K., Zhang Y. IL-17 promotes keratinocyte proliferation via the downregulation of C/EBP α . *Exp. Ther. Med.* 2016;11(2):631-636. DOI 10.3892/etm.2015.2939.
- Maneczinger M., Kemény L. Novel factors in the pathogenesis of psoriasis and potential drug candidates are found with systems biology approach. *PLoS One.* 2013;8(11):e80751. DOI 10.1371/journal.pone.0080751.
- Matsushime H., Ewen M.E., Strom D.K., Kato J.Y., Hanks S.K., Roussel M.F., Sherr C.J. Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34PSK-J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins. *Cell.* 1992;71(2):323-334.
- Mezentsev A., Nikolaev A., Bruskin S. Matrix metalloproteinases and their role in psoriasis. *Gene.* 2014;540(1):1-10. DOI 10.1016/j.gene.2014.01.068.
- Michalek I.M., Loring B., John S.M. A systematic review of worldwide epidemiology of psoriasis. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol.* 2017;31(2):205-212. DOI 10.1111/jdv.13854.
- Mills K.H. Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *Eur. J. Immunol.* 2008;38(10):2636-2649. DOI 10.1002/eji.200838535.
- Mishina O.S., Dvornikov A.S., Dontsova E.V. Psoriasis and psoriatic arthritis: Analysis of 2009–2011 incidence rates in the Russian Federation. *Doctor.ru.* 2013;4:52-55. (in Russian)
- Mogulevtseva J.A., Mezentsev A.V. Optimization of lentiviral transduction of immortalized epidermal keratinocytes. *Modern Science: Theory and Practice.* 2017;13:123-134. (in Russian)
- Nair R.P., Duffin K.C., Helms C., Ding J., Stuart P.E., Goldgar D., Gudjonsson J.E., Li Y., Tejasvi T., Feng B.J., Ruether A., Schreiber S., Weichenthal M., Gladman D., Rahman P., Schrodli S.J., Prahald S., Guthery S.L., Fischer J., Liao W., Kwok P.Y., Menter A., Lathrop G.M., Wise C.A., Begovich A.B., Voorhees J.J., Elder J.T., Krueger G.G., Bowcock A.M., Abecasis G.R., for the Collaborative Association Study of Psoriasis. Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF- κ B pathways. *Nat. Genet.* 2009;41(2):199-204. DOI 10.1038/ng.311.
- NCBI Probe. 2015. Available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/>
- Noh M., Yeo H., Ko J., Kim H.K., Lee C.H. MAP17 is associated with the T-helper cell cytokine-induced down-regulation of filaggrin transcription in human keratinocytes. *Exp. Dermatol.* 2010;19(4):355-362. DOI 10.1111/j.1600-0625.2009.00902.x.
- Pagano M., Pepperkok R., Verde F., Ansorge W., Draetta G. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J.* 1992;11(3):961-971.
- Peric M., Koglin S., Dombrowski Y., Gross K., Bradac E., Büchau A., Steinmeyer A., Zügel U., Ruzicka T., Schaubert J. Vitamin D analogs differentially control antimicrobial peptide/“alarmin” expression in psoriasis. *PLoS One.* 2009;4(7):e6340. DOI 10.1371/journal.pone.0006340.
- Peric M., Koglin S., Kim S.M., Morizane S., Besch R., Prinz J.C., Ruzicka T., Gallo R.L., Schaubert J. IL-17A enhances vitamin D3-induced expression of cathelicidin antimicrobial peptide in human keratinocytes. *J. Immunol.* 2008;181(12):8504-8512.
- Rao K.S., Babu K.K., Gupta P.D. Keratins and skin disorders. *Cell. Biol. Int.* 1996;20(4):261-274.
- Reischl J., Schwenke S., Beekman J.M., Mrowietz U., Stürzebecher S., Heubach J.F. Increased expression of Wnt5a in psoriatic plaques. *J. Invest. Dermatol.* 2007;127(1):163-169. DOI 10.1038/sj.jid.5700488.
- Rukavishnikova V.M. Change of nails at psoriasis. *Vestnik Dermatologii i Venerologii = Bulletin of Dermatology and Venereology.* 2009;2:71-79. (in Russian)
- Schindelin J., Rueden C.T., Hiner M.C., Eliceiri K.W. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Mol. Reprod. Dev.* 2015;82(7-8):518-529. DOI 10.1002/mrd.22489.
- Scott K.A., Arnott C.H., Robinson S.C., Moore R.J., Thompson R.G., Marshall J.F., Balkwill F.R. TNF- α regulates epithelial expression of MMP-9 and integrin α v β 6 during tumour promotion. A role for TNF- α in keratinocyte migration? *Oncogene.* 2004;23(41):6954-6966. DOI 10.1038/sj.onc.1207915.
- Seo K.Y., Kitamura K., Han S.J., Kelsall B. Th17 cells mediate inflammation in a novel model of spontaneous experimental autoimmune lacrimal keratoconjunctivitis with neural damage. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2017; pii: S0091-6749(17)31504-X. DOI 10.1016/j.jaci.2017.07.052.
- Seo M.D., Kang T.J., Lee C.H., Lee A.Y., Noh M. HaCaT keratinocytes and primary epidermal keratinocytes have different transcriptional profiles of cornified envelope-associated genes to T helper cell cytokines. *Biomol. Ther. (Seoul).* 2012;20(2):171-176. DOI 10.4062/biomolther.2012.20.2.171.
- Shilova L.N., Pan'shina N.N., Chernov A.S., Trubenko Y.A., Khortieva S.S., Morozova T.A., Pan'shin N.G. Immunopathological significance of interleukin-17 in psoriatic arthritis. *Sovremennye Problemy Nauki i Obrazovaniya = Current Problems of Science and Education.* 2015;6:54. (in Russian)
- Sobolev V.V., Starodubtseva N.L., Soboleva A.G., Rakhimova O.Yu., Korsunskaya I.M., Piruzian E.S., Minnibaev M.T., Krivoschapov L., Bruskin S.A., Voron'ko O.E. Role of interleukins in psoriasis. *Sovremennye Problemy Dermatovenerologii, Immunologii i Vrachebnoy Kosmetologii = Current Problems of Dermatovenerology, Immunology, and Medical Cosmetology.* 2010;5(5):79-84. (in Russian)
- Soboleva A.G., Mezentsev A., Zolotarev A., Bruskin S., Piruzian E. Three-dimensional skin models of psoriasis. *Cells Tissues Organs.* 2014a;199(5-6):301-310. DOI 10.1159/000369925.
- Soboleva A.G., Zolotarev A.D., Sobolev V.V., Bruskin S.A., Piruzian E.S., Mezentsev A.V. Genetically predetermined limitation in HaCaT cells that affects their ability to serve as an experimental model of psoriasis. *Russ. J. Genetics (Moscow).* 2014b;50(10):1081-1089. DOI 10.1134/S1022795414100123.
- Starodubtseva N.L., Sobolev V.V., Soboleva A.G., Nikolaev A.A., Bruskin S.A. Genes expression of metalloproteinases (*MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-9*, and *MMP-12*) associated with psoriasis. *Russ. J. Genetics (Moscow).* 2011;47(9):1117-1123. DOI 10.1134/S102279541109016X.
- Tohyama M., Hanakawa Y., Shirakata Y., Dai X., Yang L., Hirakawa S., Tokumaru S., Okazaki H., Sayama K., Hashimoto K. IL-17 and IL-22 mediate IL-20 subfamily cytokine production in cultured keratinocytes via increased IL-22 receptor expression. *Eur.*

- J. Immunol. 2009;39(10):27792788. DOI 10.1002/eji.200939473.
- Vegfors J., Ekman A.K., Stoll S.W., Bivik Eding C., Enerbäck C. Psoriasis (S100A7) promotes stress-induced angiogenesis. *Br. J. Dermatol.* 2016;175(6):1263-1273. DOI 10.1111/bjd.14718.
- Wells J.M., Gaggari A., Blalock J.E. MMP generated matrikines. *Matrix Biol.* 2015;44-46:122-129. DOI 10.1016/j.matbio.2015.01.016.
- Wu Y., Zhu L., Liu L., Zhang J., Peng B. Interleukin-17A stimulates migration of periodontal ligament fibroblasts via p38 MAPK/NF- κ B-dependent MMP-1 expression. *J. Cell. Physiol.* 2014;229(3):292-299. DOI 10.1002/jcp.24444.
- Yazici A.C., Tursen U., Apa D.D., Ikizoglu G., Api H., Baz K., Tasdelen B. The changes in expression of ICAM-3, Ki-67, PCNA, and CD31 in psoriatic lesions before and after methotrexate treatment. *Arch. Dermatol. Res.* 2005;297(6):249-255. DOI 10.1007/s00403-005-0602-8.
- Zolotarev A., Chekalin E., Mesentsev A., Kiseleva L., Gribanova E., Mehta R., Baranova A., Tatarinova T.V., Piruzian E.S., Bruskin S. Integrated computational approach to the analysis of RNA-seq data reveals new transcriptional regulators of psoriasis. *Exp. Mol. Med.* 2016;48(11):e268. DOI 10.1038/emmm.2016.97.



Исследование влияния гипотермической консервации на уровень натрия в клетках эндотелия трансплантата роговицы

Г.С. Батурина¹, И.Г. Пальчикова², А.А. Конев², Е.С. Смирнов², Л.Е. Каткова¹, Е.И. Соленов^{1, 3, 4}, И.А. Исаков⁵

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

² Конструкторско-технологический институт научного приборостроения Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

⁴ Новосибирский государственный технический университет, Новосибирск, Россия

⁵ Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» им. академика С.Н. Федорова Минздрава России, Новосибирский филиал, Новосибирск, Россия

Транспорт воды и ионов клетками эндотелия роговицы определяет ее жизнеспособность и оптические свойства. Исследовали влияние гипотермической консервации роговицы глаза на концентрацию натрия в клетках эндотелия роговицы. С этой целью определяли внутриклеточную концентрацию натрия в клетках эндотелия роговицы глаза свиньи после гипотермической консервации при 4 °C в течение 1 и 10 суток и трансплантатов роговицы человека после 10 суток консервации. Концентрацию внутриклеточного натрия определяли флуориметрическим методом с помощью флуоресцентного красителя SodiumGreen в препаратах клеток эндотелия. Анализ флуоресцентных изображений клеток проводили с применением оригинальной программы CytoDynamics. Расчет концентраций натрия в клетках эндотелия роговицы свиньи выявил значительное повышение уровня внутриклеточного натрия после гипотермической консервации. Показано статистически значимое снижение проницаемости для натрия плазматических мембран клеток эндотелия после консервации. Уровень внутриклеточного натрия в клетках эндотелия препаратов роговицы человека после гипотермической консервации был выше, чем в аналогичных образцах эндотелия роговицы свиньи. Концентрация внутриклеточного натрия – перспективный интегральный показатель функциональной компетентности клеток эндотелия исследуемого образца роговицы.

Ключевые слова: гипотермическая консервация; трансплантат роговицы глаза; внутриклеточный натрий; эндотелий роговицы глаза.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Батурина Г.С., Пальчикова И.Г., Конев А.А., Смирнов Е.С., Каткова Л.Е., Соленов Е.И., Исаков И.А. Исследование влияния гипотермической консервации на уровень натрия в клетках эндотелия трансплантата роговицы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(4):433-437. DOI 10.18699/VJ18.379

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Baturina G.S., Palchikova I.G., Konev A.A., Smirnov E.S., Katkova L.E., Solenov E.I., Isakov I.A. Study of the effect of hypothermic conservation on the intracellular sodium concentration in the endothelium of corneal transplants. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(4):433-437. DOI 10.18699/VJ18.379 (in Russian)

Received 17.11.2017

Accepted for publication 12.02.2018

© AUTHORS, 2018

Study of the effect of hypothermic conservation on the intracellular sodium concentration in the endothelium of corneal transplants

G.S. Baturina¹, I.G. Palchikova², A.A. Konev², E.S. Smirnov², L.E. Katkova¹, E.I. Solenov^{1, 3, 4}, I.A. Isakov⁵

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

² Technological Design Institute of Scientific Instrument Engineering SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

⁴ Novosibirsk State Technical University, Novosibirsk, Russia

⁵ S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Novosibirsk Branch, Novosibirsk, Russia

Endothelial keratoplasty has become the treatment of choice for corneal endothelial dysfunction. Advancements in the surgical treatment of corneal endothelial diseases depend on progress in graft conservation and its related advantages in assessing the suitability of grafts for transplantation. Transport of water and ions by cornea endothelium is important for the optic properties of cornea. In this work, we study the intracellular sodium concentration in cornea endothelial cells in samples of pig cornea that underwent hypothermic conservation for 1 and 10 days and endothelial cells of human cornea grafts after 10-day conservation. The concentration of intracellular sodium in preparations of endothelial cells was assayed using fluorescent dye SodiumGreen. The fluorescent images were analyzed with the custom-made computer program CytoDynamics. An increased level of intracellular sodium was shown in the endothelium after 10-day conservation in comparison with one-day conservation (pig samples). Sodium permeability of pig endothelial cell plasma membranes significantly decreased in these samples. Assessment of intracellular sodium in human cornea endothelium showed a higher level – as was in analogues pig samples of the corneal endothelium. The assay of the intracellular sodium balance concentration established in endothelial cells after hypothermic conservation in mediums L-15 and Optisol-GS showed a significant advantage of specialized medium Optisol-GS. The balanced intracellular concentration after 10 days of hypothermic conservation was significantly lower in cells incubated at 4 °C in Optisol-GS ($L-15, 128 \pm 14, n = 15$; Optisol-GS, $108 \pm 14, n = 11$; mM, $p < 0.001$). Intracellular sodium concentration could be a useful parameter for assessing cornea endothelium cell viability.

Key words: hypothermic conservation; corneal transplants; intracellular sodium; corneal endothelium.

Одна из проблем кератопластики – предупреждение отека трансплантата. Эффективность восстановления роговичного трансплантата зависит от интенсивности транспорта электролитов и воды через эндотелий роговицы, важной функцией которого является поддержание осмотического равновесия роговицы. Успешность сквозной кератопластики во многом зависит от функционального состояния эндотелия. Нарушение этого клеточного слоя ведет к болезни трансплантата. Эндотелий представляет собой клеточный монослой, целостность которого необходима для его функционирования как насоса, регулирующего осмотический баланс матрикса роговицы. Водно-электролитное равновесие матрикса роговицы определяется интенсивностью транспорта осмолитов и воды клетками роговичного эндотелия. Снижение транспорта воды и ионов этими клетками приводит к отеку роговицы и снижению ее прозрачности. Определение жизнеспособных эндотелиальных клеток с применением красителя трепановый синий с помощью теста на фрагментацию ДНК (TUNEL assay) не позволяет оценивать состояние собственно транспортных механизмов клеток эндотелия. В то же время не существует общепринятого метода прямой оценки транспортной функции эндотелия и направленного в переднюю камеру глаза потока воды и ионов (Bonanno, 2012; Schmedt et al., 2012). В молекулярный механизм этого транспорта на базальной, обращенной к матриксу роговицы, поверхности эндотелия входят: Na/K-АТФаза, электрогенный натрий-бикарбонат котранспортер ($1\text{Na}^+ : 2\text{HCO}_3^-$, *SLC4A4*, NBCe1), $\text{Na}^+ : \text{K}^+ : 2\text{Cl}^-$ (NKCC), ионообменники: хлорид-бикарбонат ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, *SLC4A2*, AE2) и натрий-протонный (Na^+/H^+ , *SLC9A6*, NHE1) (Riley et al., 1995; Kuang et al., 2004). На апикальной поверхности идентифицированы хлоридные каналы CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) и CaCC (Calcium activated Chloride Channel (CLCA1)), которые, по-видимому, не вносят значительного вклада в общий транспорт и активируются только в стрессовых ситуациях (Bonanno, 2003). Каналы проницаемы и для бикарбонат иона как $4/1 \text{ Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. В эндотелиальных клетках роговицы отмечают высокую плотность митохондрий. Производимый ими АТФ служит не только субстратом для Na/K-АТФазы, но и сигнальным фактором, как и внутриклеточный кальций, через пуриnergические рецепторы способен повышать проводимость апикальной поверхности для HCO_3^- , активируя CaCC (Bonanno, 1999). В механизме трансэпителиального переноса ионов и воды основным источником энергии для векторного транспорта является Na/K-АТФаза. Наряду с другим электрогенным транспортером, NBCe1, Na/K-АТФаза создает градиент электрохимического потенциала натрия на плазматической мембране эндотелиальных клеток, что служит вторичным источником энергии для выполнения этими клетками функции «насоса». Таким образом, естественно рассматривать концентрацию внутриклеточного натрия как результат баланса активности натрий-калиевого насоса и потоков через каналы и ионообменники плазматической мембраны клетки.

В настоящей работе проведено исследование влияния гипотермической инкубации на равновесную концентрацию внутриклеточного натрия в клетках эндотелия

роговицы, устанавливающуюся в клетках после прекращения консервации, и зависимости этого параметра от среды, в которой ткань роговицы сохранялась в условиях гипотермии.

Материалы и методы

Культура клеток и микроскопия. Исследовали влияние гипотермической консервации роговицы свиньи и человека на способность эндотелиоцитов восстанавливать внутриклеточную концентрацию натрия ($[\text{Na}^+]_i$) после прекращения гипотермии. Фрагменты роговицы человека в виде трепанированных дисков получали в процессе выполнения сквозной кератопластики у пациентов с кератоконусом. Препараты роговицы свиньи помещали в чашки Петри, заполненные культуральной средой L-15 Leibovitz (Sigma, США). Препараты роговицы человека инкубировали в среде L-15 и Optisol-GS. Препараты роговицы свиньи – в течение 1 и 10 суток, человека – 10 суток инкубировали при 4 °C. Переживающую культуру клеток эндотелия роговицы получали переносом клеток на покровное стекло. С этой целью фрагмент роговицы инкубировали в растворе коллагеназы (1 мг/мл Collagenase, Sigma (США) в PBS при 37 °C, 30 мин), затем делали отпечаток эндотелия на покровное стекло, покрытое полилизинном (Poly-L-lysine solution 0.1 % (w/v) H_2O , Sigma, США). Таким методом получали препарат клеток эндотелия, обращенных базальной стороной в сторону омывающего раствора. Экспериментальная установка представляла собой проточную камеру, разработанную для использования с флуоресцентным микроскопом Observer-Z1 (объектив Fluor 20×/0.75 M27, Zeiss, Германия). Объем камеры составлял около 50 мкл, скорость протекания раствора – 25 мл/мин, смена омывающего раствора происходила в течение 100 мс, поддерживаемая температура 36.8 ± 0.2 °C. Флуоресцентные изображения клеток записывали с помощью камеры AxioCam HSm, используя набор фильтров и дихроическое зеркало #009 (Zeiss, Германия). Регистрацию изображений производили с помощью монохромной ПЗС-камеры AxioCam HSm (Zeiss, Германия) с интервалом 30 с на протяжении всего эксперимента при низкой интенсивности возбуждающего света, что позволяло избежать выгорания флуорофора во время эксперимента. Серии цифровых изображений регистрировали с дигитализацией 12 бит в режиме линейного преобразования падающей интенсивности и сохраняли на компьютере в формате <.tif>. Измерения интенсивности флуоресценции проводили с помощью аналитической программы CytoDynamics с записью результатов измерения динамики интенсивностей индивидуальных клеток в формате таблиц Excel.

Измерение концентрации внутриклеточного натрия. Концентрацию натрия в клетках $[\text{Na}^+]_i$ определяли флуориметрическим методом с помощью флуоресцентного красителя SodiumGreen (MolecularProbes, США) согласно протоколу (Solenov, 2008). Сигнал калибровали, помещая клетки в фосфатный солевой буфер (PBS) с различной концентрацией Na^+ (138 и 10 mM в присутствии 10^{-4} M Na^+ ионофора Nystatin (AppliChem, Германия)). Гипонатриевый раствор (10 mM NaCl) готовили на основе изотонического PBS, в котором часть натрия замещали

на *n*-methyl-D-glucamine (NMDG) (ICN Biomedicals, США). Для измерения покровное стекло с клетками эндотелия переносили в раствор PBS (138 mM NaCl, 4.7 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 0.5 mM MgCl₂, 5.5 mM глюкоза, 0.1 mM CaCl₂). Клетки загружали флуоресцентным красителем Sodium Green TA (10⁻⁵ M, 40 min 37 °C, Molecular Probes, США). Стеклянные клетки помещали в камеру флуоресцентного микроскопа. В ходе эксперимента клетки первые 10 мин (период I) находились при температуре 10 °C, затем 10 мин – при 37 °C (период II) и последующие 10 мин (период III) – в среде PBS, содержащей 10 mM Na⁺, а часть натрия была замещена органическим катионом (10 mM натрия, 128 mM NMDG) при температуре 37 °C и 10 мин в присутствии 100 ед./мл нистатина (Sigma, США). Для оценки проницаемости плазматической мембраны для ионов натрия создавали ступенчатый градиент сменой среды, содержащей 138 и 10 mM натрия. Экспериментальные записи изменения флуоресценции нормировали по амплитуде и определяли скорость изменения как внутриклеточного натрия, так и клеточного объема, находили коэффициент линейной регрессии начального участка кривой флуоресценции, как это описано нами ранее (Ilyashin et al., 2014).

Анализ экспериментальных данных по динамике внутриклеточной концентрации натрия с целью получения количественных оценок проницаемости мембраны клеток для ионов натрия производили с помощью математической модели главных компонент собираемых трубок почки, разработанной нами ранее (Ильяшин и др., 2011). Исходя из средних значений интенсивности флуоресценции на стационарных участках профиля, соответствующих внутриклеточной концентрации натрия, равной 138 mM при температуре 10 °C и 10 mM в присутствии 100 ед./мл нистатина, рассчитывали стационарную концентрацию натрия в клетках при 37 °C.

Анализ микроизображений с помощью программы CytoDynamics. Для реализации компьютерной флуориметрии нами был разработан специализированный программный пакет CytoDynamics (№ госрегистра-

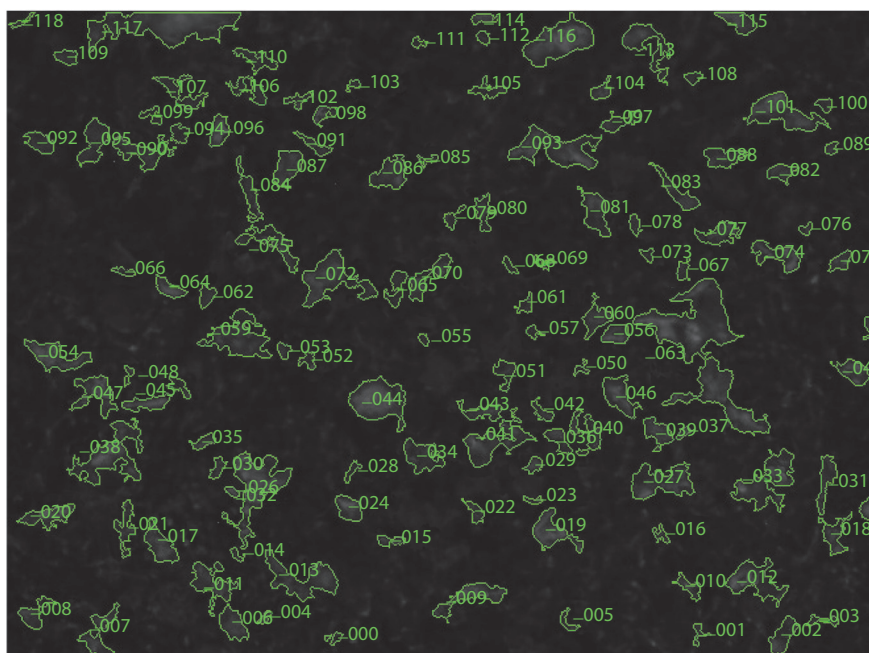


Fig. 1. Processed digital image of the preparation with outlined areas of interest.

ции 2016612766). Для математической обработки берутся файлы, получаемые непосредственно с камеры, пакет CytoDynamics определяет контуры групп и индивидуальных клеток (области интереса (ОИ)) на начальном кадре серии и удерживает контур изображения на последующих во времени снимках (рис. 1). На изображении каждой ОИ программа определяет периметр, площадь и интегральную интенсивность флуоресценции, которая пропорциональна внутриклеточной концентрации натрия (Winslow et al., 2002; Конев, Пальчикова, 2015; Пальчикова и др., 2015). Осреднение интенсивности выполняется по всем изображениям одного кадра.

Статистика. Для интенсивности флуоресценции рассчитывали среднее значение, дисперсию и стандартную ошибку среднего. Для профилей, построенных на основании средних значений флуоресценции, в каждой точке рассчитывали среднее значение и стандартную ошибку среднего ($M \pm SD$). Достоверности различий определяли с применением пакета ANOVA и *t*-критерия.

Результаты

На рис. 2 приведены профили средней интегральной интенсивности флуоресценции клеток эндотелия роговицы свиньи.

В эксперименте по изучению эффекта гипотермической консервации на баланс натрия в клетках эндотелия роговицы свиньи кривая интенсивности флуоресценции имеет три характерных квазистационарных участка, на которых интенсивность флуоресценции изменяется незначительно. Это отражает стабилизацию внутриклеточной концентрации натрия в эти интервалы. Интенсивность флуоресценции в периоде II соответствует величинам равновесной внутриклеточной концентрации натрия, которая устанавливается в клетке после входа натрия через транспортеры плазматической мембраны и выхода, определяемого активностью Na/K-АТФазы. При температуре 10 °C активность Na/K-АТФазы подавлена, и в клетках устанавливается концентрация натрия, равновесная со средой (138 mM), при повышении температуры до 37 °C в результате активации натрий-калиевого насоса устанавливается более низкая равновесная концентрация внутриклеточного натрия, которая зависит от времени консервации (1 сутки: 27.3 ± 1.9 mM, $n = 110$; 10 суток: 69.2 ± 4.7 mM, $n = 70$). В третьей фазе эксперимента в присутствии ионофора в клетке устанавливается концентрация натрия, соответствующая его концентрации в калибровочном растворе (10 mM). Из анализа результатов измерений

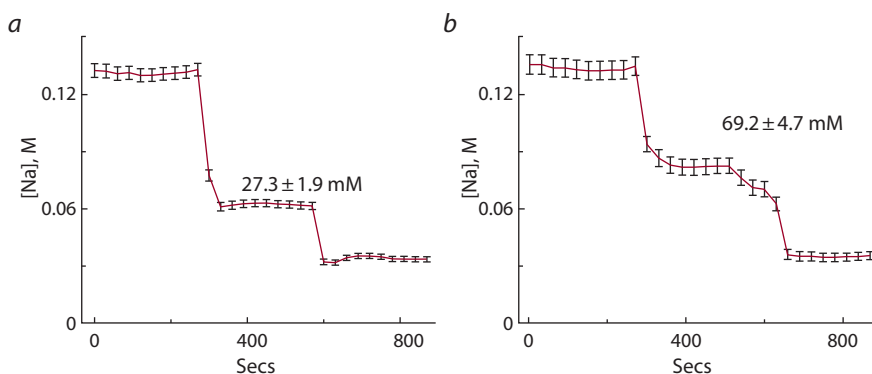


Fig. 2. Sodium Green fluorescence profiles in endothelial cells of porcine cornea after incubation at 4 °C for (a) one day, (b) ten days.

Intracellular sodium concentration: (a) 27.3 ± 1.9 mM, $n = 110$; (b) 69.2 ± 4.7 mM, $n = 70$. The experimental design is described in Methods.

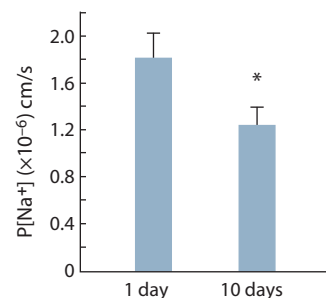


Fig. 3. Plasma membrane permeability to sodium in endothelial cells of porcine cornea after incubation at 4 °C: for one day, 1.8 ± 0.021 , $n = 10$; for ten days, 1.2 ± 0.015 ($\times 10^{-6}$) cm/s, $n = 8$.

* $p < 0.01$. Y-Axis: permeability coefficient for sodium ($\times 10^{-6}$ cm/s).

$[Na^+]_i$ следует, что в клетках, подвергавшихся гипотермической инкубации в течение 10 суток, происходит значительное повышение $[Na^+]_i$ по сравнению с однодневной консервацией. Определение проницаемости плазматической мембраны клеток для натрия по скорости входа иона в экспериментах со ступенчатым градиентом этого иона в изотонической среде показывает, что гипотермическая консервация в течение 10 суток привела к снижению проницаемости плазматической мембраны клеток (одни сутки: 1.8 ± 0.021 , $n = 10$; 10 суток: 1.2 ± 0.015 ($\times 10^{-6}$) см/с, $n = 8$, $p < 0.01$) (рис. 3).

В этом протоколе проведен эксперимент по влиянию состава среды на баланс внутриклеточного натрия в клетках эндотелия роговицы человека после гипотермической консервации в средах L-15 и Optisol-GS. Для эксперимента каждый фрагмент роговицы был разделен на две части, и обе части подвергались гипотермии в соответствующих средах. Как показали измерения равновесной внутриклеточной концентрации натрия после 10-суточной инкубации при 4 °C, транспортная активность клеток эндотелия значительно лучше сохранилась в специализированной среде (128 ± 14 , $n = 15$; 108 ± 14 , $n = 11$; мМ, $p < 0.001$, L-15 и Optisol-GS соответственно). Ввиду малого количества материала проницаемость для натрия в эндотелии роговицы человека не определяли. В экспериментах с роговицей свиньи были установлены значения проницаемости для натрия и его равновесная концентрация в клетках после гипотермической консервации. Согласно полученным данным, гипотермическая консервация в среде L-15, которая была контролем по отношению к специализированной консервационной среде Optisol-GS, приводила к значительному повышению равновесной концентрации натрия. Можно предположить, что это обусловлено снижением транспортной активности Na/K-АТФазы.

Обсуждение

Клетки эндотелия роговицы формируют клеточный монослой, от целостности которого зависит способность эндотелия выполнять его транспортную функцию и, соответственно, регулировать осмотический баланс стромы роговицы. Так как клетки эндотелия остановлены в фазе клеточного цикла G1, они не проходят митотическое деление (Maucosk, Marshall, 2014). С возрастом часть клеток гибнет и целостность клеточного слоя сохраняется за счет оставшихся живых клеток, которые также формируют сплошной клеточный слой, но с меньшим количеством клеток. В связи этим до настоящего времени одним из основных критериев функциональности эндотелия и пригодности препарата роговицы для трансплантации является плотность клеток эндотелия (ECD), которая снижается с возрастом донора (Vianna et al., 2016). В различных глазных банках приняты минимальные пороговые значения ECD: от 2500 до 2000 (мм⁻²). (Whitcher et al., 2001; Boynton, Woodward, 2014). Этот показатель дает принципиальное представление о пригодности роговицы для транспланта-

ции, но не позволяет оценивать функциональность эндотелия как регулятора осмотического баланса матрикса. В то же время возможность определения транспортного потенциала клеток эндотелия будет иметь значение как для установления пригодности транспланта после периода консервации, так и в исследовательских целях при изучении эффективности создаваемых рецептур новых сред для консервации. Предлагаемый в настоящей работе подход основан на анализе баланса потоков натрия индивидуальных клеток эндотелия. Трансмембранный электрохимический градиент натрия создается натрий-калиевой АТФазой и служит значимым вторичным источником энергии для транспортных процессов в клетке. Таким образом, поскольку внеклеточная концентрация натрия в организме – гомеостатическая величина, можно считать внутриклеточную активность ионов натрия адекватным показателем функциональной возможности транспортного механизма клетки.

Этот подход открывает возможность исследовать функциональное состояние транспортных систем клеток эндотелия роговицы при использовании незначительного количества исследуемой ткани. Принятое в настоящее время описание функции эндотелия посредством *pinp*-leak модели разделяет потоки активного и осмотического переноса. Поскольку интенсивность активных транспортных процессов в клетке определяется функцией Na/K-АТФазы, анализ ба-

ланса потоков натрия на уровне клетки может отражать «насосную» функцию эндотелия. Способность поддерживать градиент электрохимического потенциала натрия на плазматической мембране может служить достаточно надежным критерием функционального состояния транспортных систем клетки в целом.

Суммарные потоки натрия через плазматическую мембрану зависят от соотношения потоков натрия из клетки, что определяется активностью Na/K-АТФазы и поток натрия в клетку через транспортеры, находящиеся в мембране. Суммарная активность определяется проницаемостью мембраны для натрия (Bachmann et al., 1999; Féraillé, Doucet, 2001; Solenov 2008). Повышение стационарной концентрации ионов натрия в клетках эндотелия указывает на повреждающее воздействие гипотермической консервации на транспортные механизмы. Это может объяснять высокие концентрации натрия в клетках эндотелия роговицы человека, обнаруженные нами. Поскольку в экспериментах гипотермическому воздействию подвергались препараты роговицы человека, страдавшего кератоконусом, их эндотелий исходно мог иметь сниженную функциональную активность, с чем и могут быть связаны более высокие уровни концентрации внутриклеточного натрия, выявленные в эндотелиоцитах роговицы человека. Относительно эффекта среды консервации, естественно предположить, что он связан с протекторным действием совокупности ее компонентов, повышающим сохранность и последующее восстановление активности транспортеров. Полученные результаты подтверждают исходное предположение о том, что степень восстановления транспортных функций в клетках эндотелия роговицы зависит от продолжительности гипотермического воздействия. Вопрос, в какой мере способность индивидуальных клеток эндотелия регулировать баланс внутриклеточного натрия связана с функцией регуляции осмотического баланса трансплантата, нуждается в дальнейшем изучении.

Важным выводом выполненного исследования является заключение о том, что концентрацию внутриклеточного натрия можно рассматривать как перспективный интегральный показатель функциональной компетентности клеток эндотелия исследуемого образца роговицы.

Acknowledgments

This work was supported by State Budgeted Project 0324-2018-0016 and by the Russian Foundation for Basic Research, project 17-04-00328.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Bachmann S., Bostanjoglo M., Schmitt R., Ellison D.H. Sodium transport-related proteins in the mammalian distal nephron – distribution, ontogeny and functional aspects. *Anat. Embryol. (Berl.)*. 1999; 200(5):447-468.

- Bonanno J.A. Identity and regulation of ion transport mechanisms in the corneal endothelium. *Prog. Retin Eye Res.* 2003;22(1):69-94.
- Bonanno J.A. Molecular mechanisms underlying the corneal endothelial pump. *Exp. Eye Res.* 2012;95:2-7.
- Boynton G.E., Woodward M.A. Eye-bank preparation of endothelial tissue. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 2014;25(4):319-324.
- Féraillé E., Doucet A. Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. *Physiol. Rev.* 2001;81(1):345-418.
- Ilyaskin A.V., Baturina G.S., Medvedev D.A., Ershov A.P., Solenov E.I. A mathematical model of the response of principal cells of collecting ducts to hypotonic shock. *Biofizika = Biophysics*. 2011;56(3):550-560. (in Russian)
- Ilyaskin A.V., Karpov D.I., Medvedev D.A., Ershov A.P., Baturina G.S., Katkova L.E., Solenov E.I. Quantitative estimation of transmembrane ion transport in rat renal collecting duct principal cells. *Gen. Physiol. Biophys.* 2014;33(1):13-28.
- Konev A.A., Palchikova I.G. The OPENCV library and its use on cytophotometry tasks. The panel “Remote Sensing of the Earth, photogrammetry, environmental monitoring, and geoecology”. The 11th International congress “Interexpo Geo-Siberia-2015”, in two volumes. Novosibirsk: SSUGT, 2015;2:71-76. (in Russian)
- Kuang K., Li Y., Yiming M., Sánchez J.M., Iserovich P., Cragoe E.J., Diecke F.P., Fischbarg J. Intracellular [Na⁺], Na⁺ pathways, and fluid transport in cultured bovine corneal endothelial cells. *Exp. Eye Res.* 2004;79(1):93-103.
- Maycock N.J., Marshall J. Genomics of corneal wound healing: a review of the literature. *Acta Ophthalmol.* 2014;92(3):e170-e184.
- Otsu N.A. Threshold Selection method from gray-level histograms. *IEEE Trans. Syst. Man Cyber.* 1979;9(1):62-66.
- Palchikova I.G., Konev A.A., Sмирнов E.S. Image segmentation in the computer cytophotometry. The panel “Remote Sensing of the Earth, photogrammetry, environmental monitoring, and geoecology”. The 11th International congress “Interexpo Geo-Siberia-2015”, in two volumes. Novosibirsk: SSUGT, 2015;2:49-55. (in Russian)
- Riley M., Winkler B., Czajkowski C., Peters M. The roles of bicarbonate and CO₂ in transendothelial fluid movement and control of corneal thickness. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1995;36:103-112.
- Schmedt T., Silva M.M., Ziaei A., Jurkunas U. Molecular bases of corneal endothelial dystrophies. *Exp. Eye Res.* 2012;95:24-34.
- Solenov E.I. Cell volume and sodium content in rat kidney collecting duct principal cells during hypotonic shock. *J. Biophys.* 2008; 2008:420963.
- Vianna L.M., Li H.D., Holiman J.D., Stoeger C., Belfort R. Jr., Jun A.S. Characterization of cryopreserved primary human corneal endothelial cells cultured in human serum-supplemented media. *Arq. Bras. Oftalmol.* 2016;79(1):37-41.
- Whitcher J.P., Srinivasan M., Upadhyay M.P. Corneal blindness: a global perspective. *Bull. World Health Organ.* 2001;79(3):214-221.
- Winslow J.L., Cooper R.L., Atwood H.L. Intracellular ionic concentration by calibration from fluorescence indicator emission spectra, its relationship to the K(d), F(min), F(max) formula, and use with Na-Green for presynaptic sodium. *J. Neurosci. Methods.* 2002; 118(2):163-175.

The characteristics of miRNA binding sites in mRNA of *ZFHX3* gene and its orthologs

A.M. Kondybayeva¹, A.N. Akimniyazova², S.U. Kamenova¹, A.T. Ivashchenko²✉

¹ Asfendiyarov Kazakh National Medical University, Almaty, Kazakhstan

² Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

Transcription factor gene *ZFHX3* is one of the candidate genes involved in stroke development. The *ZFHX3* protein contains oligopeptides encoded by trinucleotide repeats (TNRs). TNR variability is considered to be one of the causes of the disease, but their biological function has not yet been established. We assume that TNRs are the binding sites of miRNA to mRNA and are involved in regulation of *ZFHX3* gene expression. The characteristics of miRNA-mRNA interaction were determined using MirTarget software. It has been shown that the first TNR in mRNA of the human *ZFHX3* gene consists of the seven consecutive miR-12-32603-3p binding encoding polyGlu. The *ZFHX3* protein of human polyGlu contains 30 Glu. In the orthologous proteins of 36 animal species the length of polyGlu varied from 27 Glu to 33 Glu. Negatively charged polyGlu of the *ZFHX3* transcription factor probably interacted with positive DNA-binding proteins. The following mRNA region of the *ZFHX3* gene contained the binding sites for miR-17-39416-3p, miR-5-15733-3p, miR-9-20317-3 encoding polyAla by 15 Ala lengths. In the 33 *ZFHX3* orthologous proteins polyAla had the same length. The mRNA region of the human *ZFHX3* gene with binding polysite of miR-1322-3p encoded polyGln consisting of 19 Gln. In the 41 orthologs of the *ZFHX3* protein the length of polyGln varied from seven Gln to 23 Gln. The binding sites of miR-2-6184-3p, miR-5-14114-5p and miR-19-43437-5p were located with overlapping nucleotides sequences, and encode polyPro. In *ZFHX3* human polyPro consisted of 12 Pro. In the orthologs, polyPro contained from 10 Pro to 14 Pro. The binding sites of miR-17-39416-3p, miR-9-20317-3p, miR-1-1819-3p, miR-5-15733-3p, miR-6-17815-3p, miR-18-39953-5p, miR-2-6862-5p, miR-1260b and miR-X-48174-3p in human *ZFHX3* encoded polyGly by 22 Gly length. In the 28 orthologs of *ZFHX3* the length of polyGly decreased to 11 Gly. The TNR regions could simultaneously bind several miRNAs, which increased the dependence of gene expression on miRNA. The oligopeptides encoded by the binding polysites of miRNA in mRNA in the orthologous *ZFHX3* proteins were flanked by conserved oligopeptides.

Keywords: miRNA; mRNA; *ZFHX3* gene; *ZFHX3* oligopeptides; stroke.

Характеристики полисайтов связывания миРНК с мРНК гена *ZFHX3* и его ортологов

А.М. Кондыбаева¹, А.Т. Акимниязова², С.У. Каменова¹, А.Т. Иващенко²✉

¹ Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова, Алматы, Казахстан

² Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан

Ген транскрипционного фактора *ZFHX3* относится к числу кандидатных генов, участвующих в развитии инсульта. В белке *ZFHX3* имеются олигопептиды, кодируемые повторами тринуклеотидов (ПТН). Изменчивость ПТН считают одной из причин заболеваний, однако их биологическая функция не установлена. Мы предполагаем, что ПТН являются сайтами связывания миРНК с мРНК и участвуют в регуляции экспрессии гена *ZFHX3*. Характеристики взаимодействия миРНК с мРНК находили по программе MirTarget. Показано, что первый ПТН в мРНК гена *ZFHX3* человека состоит из семи последовательно расположенных сайтов связывания miR-12-32603-3p, кодирующих полиGlu. В белке *ZFHX3* человека полиGlu содержит 30 Glu. В ортологических белках 36 видов животных длина полиGlu изменялась от 27 до 33 Glu. Отрицательно заряженный полиGlu транскрипционного фактора *ZFHX3*, вероятно, взаимодействует с положительно заряженными белками, связанными с ДНК. Следующий участок мРНК гена *ZFHX3* содержит сайты связывания miR-17-39416-3p, miR-5-15733-3p, miR-9-20317-3p, которые кодируют полиAla длиной 15 Ala. В 33 ортологических белках *ZFHX3* полиAla имел одинаковую длину. Участок мРНК гена *ZFHX3* человека с полисайтом связывания miR-1322-3p кодирует полиGln, состоящий из 19 Gln. В 41 ортологе белка *ZFHX3* длина полиGln изменялась от 7 до 23 Gln. Сайты связывания miR-2-6184-3p, miR-5-14114-5p и miR-19-43437-5p расположены с наложением нуклеотидных последовательностей и кодируют полиPro. В *ZFHX3* человека полиPro состоял из 12 Pro. У ортологов он содержал от 10 до 14 Pro. Сайты связывания miR-17-39416-3p, miR-9-20317-3p, miR-1-1819-3p, miR-5-15733-3p, miR-6-17815-3p, miR-18-39953-5p, miR-2-6862-5p, miR-1260b и miR-X-48174-3p кодировали у *ZFHX3* человека полиGly длиной 22 Gly. В 28 ортологах *ZFHX3* длина полиGly уменьшалась до 11 Gly. Участки ПТН могут одновременно связывать несколько миРНК, что увеличивает зависимость экспрессии генов от миРНК. Олигопептиды, кодируемые полисайтами связывания миРНК в мРНК, в ортологических белках *ZFHX3* фланкированы консервативными олигопептидами.

Ключевые слова: миРНК; мРНК; ген *ZFHX3*; олигопептиды *ZFHX3*; инсульт.

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Kondybayeva A.M., Akimniyazova A.N., Kamenova S.U., Ivashchenko A.T. The characteristics of miRNA binding sites in mRNA of *ZFHX3* gene and its orthologs. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(4):438-444. DOI 10.18699/VJ18.380

Received 29.01.2018
Accepted for publication 29.04.2018
© AUTHORS, 2018

Some genes have been identified in stroke and they are considered as candidates to determine various subtypes of stroke (Mineharu et al., 2006; Kurzepa et al., 2014; Inose et al., 2015; Wu et al., 2017). These include the *ZFHX3* gene encoding the transcription factor involved in the regulation of expression of many genes. Disruption in *ZFHX3* gene expression was identified in stroke, atherosclerosis and other cardiovascular diseases (Liu et al., 2014; Martin et al., 2014; Chauhan et al., 2016; Hauer et al., 2017). Gene *ZFHX3*, being a transcription factor, can manifest its function in a variety of ways, and be a cause of different stroke subtypes. The gene contains trinucleotide repeats that can participate in expression of its function (Sobczak et al., 2010). It has been shown that changes in the expression of *ZFHX3* gene and other candidate stroke genes correlate with miRNA level variation (Dhiraj et al., 2013; Ji et al., 2016; Liang, Lou, 2016; Qingfeng et al., 2016; Chen et al., 2017). MicroRNAs are effective regulators of gene expression, so it is required to establish which miRNA can regulate the expression of the *ZFHX3* gene. MicroRNA interaction with mRNA is determined by the physicochemical properties of these molecules. Unfortunately, in the publications related to the subject only a few substantiated assumptions were made that led to significant errors in determining the binding sites of miRNA in mRNA and interpreting of the obtained results. Existing programs for detecting miRNA binding sites in the mRNA of target genes, unfortunately, predict many false-positive sites (Peterson et al., 2014). To search for the binding sites, we used the MirTarget program, determining the characteristics of miRNA–mRNA interaction, including the detection of multiple miRNA binding sites (Ivashchenko et al., 2014). To improve the binding sites identification their presence in the mRNA of orthologous genes was verified (Ivashchenko et al., 2013; Atambayeva et al., 2017). The identification was necessary to be aware which organisms can be selected as model organisms in the study of stroke and other cardiovascular diseases. The conducted research will help determine the effect of miRNA on the expression of *ZFHX3* and other candidate genes involved in stroke development.

Materials and methods

The nucleotide mRNA sequences of the *ZFHX3* gene and its orthologs were taken from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The following abbreviations of species names were used: *Acinonyx jubatus* – *Aju*, *Ailuropoda melanoleuca* – *Ame*, *Alligator mississippiensis* – *Ami*, *Anas platyrhynchos* – *Apl*, etc. (Supplementary table 1)¹. miRNAs were taken from miR-Base Release 21 (<http://mirbase.org>) and the article (Londin et al., 2015) (Supplementary table 2).

The search for miRNA target genes was carried out in the MirTarget program (Ivashchenko et al., 2014). The program defines the origin of miRNA binding sites with mRNA, the location of sites in the 5'-untranslated region (5'UTR), the protein-coding region (CDS) and the 3'-untranslated region (3'UTR) of mRNA, the free energy of hybridization (ΔG , kJ/mole) and schemes of miRNA nucleotides interaction with mRNA. The $\Delta G/\Delta G_m$ (%) ratio was calculated for each site, where ΔG_m is the free miRNA binding energy of a fully complementary nucleotide sequence. The miRNA binding

sites were selected to have the $\Delta G/\Delta G_m$ ratio of more than 85 %, taking into account the miRNA length and ΔG value. The position of binding sites was indicated from the first nucleotide of 5'UTR in mRNAs. The MirTarget program took into account the interactions of miRNA nucleotides with mRNA target genes not only between adenine (A) and uracil (U), guanine (G) and cytosine (C), but also between A and C, G and U, via a single hydrogen bond. The distance between A and C was equal to the G-C, A-U, and G-U distances. The numbers of hydrogen bonds in the G-C, A-U, G-U and A-C interactions were found to be 3, 2, 1 and 1, respectively. The free binding energies of these nucleotide pairs were accepted as the same values (3 : 2 : 1 : 1). The program determines the interaction of mRNA with miRNA over its entire length and allows one unpaired nucleotide in mRNA, but not in miRNA, since it is bound in the RISC complex.

Results and discussion

The miRNA binding sites in the mRNA of the *ZFHX3* gene were detected in 5'UTR, CDS, 3'UTR (Supplementary tables 3 and 4) and the vast majority of miRNA binding sites are located in the CDS. Table presents the characteristics of miRNA interaction with the mRNAs of the human *ZFHX3* gene. Some miRNAs had a single binding site in mRNA that was located separately from the binding site of the same miRNA or together with the binding sites of other miRNAs. Some miRNAs had two or more sequential binding sites, overlapped with their nucleotide sequences, we called polysites (sequentially located binding sites of the same miRNA). When polysites were located in the CDS, they encoded a sequence of one amino acid, for example, polyGln in *HTT*, *ATXN1*, *ATXN7*, *TBP*, *AR* genes, polyGly in *EVX*, *HOX*, *HOXD13*, *GATA* genes, polyGlu in *FXN* gene, polyPro in *ALG13*, *DIAPH1*, *FMNL2*, *PCLO*, *SRPK2*, *ZFHX4* genes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) etc. If the binding sites of two or more different miRNAs were located with overlapping nucleotide sequences, this mRNA site was called a multiple site. Messenger RNAs of the *ZFHX3* gene contain both poly- and multiple sites.

None of the known programs for search of miRNA binding site has been able to search for such sites. Each of the sites included in multiple miRNA binding sites can have the same miRNA interaction characteristics with mRNA. However, there are polysites and multiple miRNA binding sites including a binding site with higher mRNA–miRNA interaction characteristics. This causes a longer residence time for the RISC complex in this binding site. The remaining sites increase the probability of catching the RISC complex. With a large number of binding sites in polysites and multiple sites, mRNA can bind two or more RISC complexes including miRNA. The identification of all miRNAs that bind to mRNA of *ZFHX3* gene is necessary to evaluate their effect on the expression of *ZFHX3* gene and to determine the dependence of its expression on the expression of other genes that are targets for these miRNAs.

The simplistic understanding of the relationship between miRNA and a target gene is widely spread and states that if the binding of miRNA to the gene mRNA is established, the problem is regarded as solved. However, for this miRNA, there may be other target genes with stronger interaction, or the mRNA of one gene can interact with several miRNAs.

¹ Supplementary tables 1–16 are available in the online version of the paper: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2018-22/appx7.pdf>

Characteristics of miRNA interaction in CDS mRNAs of *ZFHX3* gene

miRNA	The beginning of site, nt	ΔG, kJ/mole	ΔG/ΔGm, %	The length, nt
miR-2-8257-5p	969	−125	88	23
miR-20-23817-3p	1810	−132	86	24
miR-12-32603-3p	2062–2113 (7)	−108 ÷ −115	86–92	23
miR-6891-3p	2120	−106	93	21
miR-17-39416-3p	2978–2996 (4)	−115	87	22
miR-1-1819-3p	2982	−121	88	23
miR-5-15733-3p	2986–3004 (3)	−127 ÷ −129	86–87	24
miR-9-20317-3p	2986–3001 (4)	−127 ÷ −129	86–87	24
miR-1322	5836–5858 (7)	−85	83	19
miR-11-29856-3p	6025	−110	93	23
miR-2-6184-3p	6793–6794 (2)	−110 ÷ −117	85–90	23
miR-5-14114-5p	6793–6802 (3)	−119 ÷ −123	86–89	23
miR-19-43437-5p	6798	−110	87	23
miR-3692-5p	8410	−119	90	24
miR-1322	10262–10271 (4)	−87 ÷ −91	85–90	19
miR-9-25681-5p	10261–10264 (2)	−100 ÷ −102	85–87	21
miR-1322	10798–10823 (4)	−83 ÷ −87	81–85	19
miR-671-5p	10874	−119	90	23
miR-6779-5p	10868	−113	93	21
miR-17-39416-3p	11193–11232 (12)	−113 ÷ −121	85–92	22
miR-9-20317-3p	11201–11234 (9)	−127 ÷ −136	87–91	24
miR-1260b	11201–11228 (6)	−89 ÷ −93	86–90	19
miR-X-48174-3p	11207–11216 (2)	−121	85	24
miR-1-1819-3p	11211–11229 (2)	−119	86	23
miR-18-39953-5p	11212–11230 (3)	−123	86	23
miR-6-17815-3p	11214	−127	86	24
miR-2-6862-5p	11218	−118	86	23
miR-5-15733-3p	11234–11240 (2)	−127 ÷ −129	86–87	24
miR-3960	11461–11483 (5)	−102 ÷ −113	81–90	20
miR-5-14114-5p	11461	−121	88	23
miR-19-21199-3p	11462–11468 (2)	−134 ÷ −138	85–88	25
mir-1-2121-3p	11463	−142	91	25
miR-1-2770-3p	11463	−123	87	24
miR-19-33623-3p	11463	−136	91	24
miR-2-6184-3p	11481	−113	87	23

Note: The number of miRNAs binding sites is indicated in parentheses.

Therefore, it is necessary, at least computationally, to know which miRNAs can bind to the genomic mRNA genes. This task can be successfully solved using our program that predicts miRNA – mRNA binding sites and determines the quantitative characteristics of this interaction.

In the mRNA protein-coding region of the *ZFHX3* gene, the miR-2-8257-5p binding site is located first and encodes the PSARPPPP octapeptide (Supplementary table 5). This binding site is present in the mRNA orthologs of the *ZFHX3* gene and

encodes an identical peptide or it is different by one or more amino acids. The QTYMEHHC peptide in front of it and the LREESASD peptide behind it are absolutely conserved in the *ZFHX3* protein of 23 animals.

The binding site of miR-20-23817-3p was located at the beginning of mRNA nucleotide sequence and encoded the PAG-SAAGP octapeptide in the orthologous proteins of 20 animal species (Supplementary table 6). In the orthologous proteins of other animal species, the miR-20-23817-3p binding site

included nucleotide substitutions and encoded octapeptides different from PAGSAAGP. However, the characteristics of miR-20-23817-3p interaction with mRNA of *ZFH3* gene of these species were comparable to those for the first group of animals, which indicated the functional ability of miR-20-23817 to regulate the *ZFH3* gene expression in these animal species. Notably, the oligopeptides MEGEEAL and EQPQAGLL adjoining to the oligopeptide encoded by the miR-20-23817-3p binding sites are absolutely conserved in the *ZFH3* protein of studied animal species.

For miR-12-32603-3p seven binding sites were identified in the mRNA of the *ZFH3* gene (see Table). They encoded polyGlu replacing two Glu positions with Ala (Supplementary table 7). The presence of polysite for miRNA binding site promoted capture of the RISC complex and its further advantageous finding in the position of the site with the maximum free energy of mRNA-miRNA interactions. The site for miR-12-32603-3p was located in the region from 2080 nt for which ΔG and $\Delta G/\Delta G_m$ values were maximum: -115 kJ/mole and 92 %, respectively. MicroR-6891-3p binding site encodes the EEEEEDE hexapeptide. It should be noted that in the 2D structure of the encoding polyGlu sites there was no intramolecular interaction of nucleotides and the entire polysite nucleotide sequence was capable of binding several RISC complexes. The mRNA region adjacent to the miRNA binding polysites from the 3'-end encoded D(E)EGCKGLF oligopeptide, and the region from the 5'-end encoded FSEKA(V)EPA oligopeptide (see Supplementary table 7). MicroR-12-32603-3p binding sites encodes from 27 to 33 amino acids in the *ZFH3* orthologous proteins. The functional role of polyGlu in the *ZFH3* protein has not been described in the literature. It is possible that hydrophilic polyGlu imparts high solubility to the transcription factor *ZFH3* and ensures its interaction with positively charged DNA-binding proteins, freeing up DNA for transcription. It means that the region of miR-12-32603-3p binding sites performs two functions: a) provides suppression of the synthesis of the transcription factor *ZFH3* by miRNA and as a result blocks the expression of *ZFH3*-dependent genes, b) without or with a lower concentration of miR-12-32603-3p, compared to the concentration of the mRNA of *ZFH3* gene, the polysite encodes a polyGlu necessarily for the functioning of the transcription factor. The synonymous codons of miR-12-32603-3p binding sites in mRNA of *Hsa*, *Mmu* and *Hgl* are used in the $GAG_{19}GAA_8GCG_2$, $GAG_{18}GAA_9GCG_1GCA_1$ and $GAG_{20}GAA_9GCG_1GCA_1$ ratios, respectively. In the third position of the codons for Glu and Ala, guanine is used.

The next region of mRNA gene containing the binding sites of miR-17-39416-3p, miR-5-15733-3p, miR-9-20317-3p, was located in the region from 2978 nt to 3027 nt (see Table). From the 5'-end to the multiple binding sites adjoins the site of mRNA region, encoding the absolutely conservative GGEQVFSH octapeptide (Supplementary table 8). From the 3'-end of the binding sites, a less homologous oligopeptide was encoded. The binding sites of miR-17-39416-3p encoded the TAGAAAAA, GAAAAAVA, AAAAFAAA and AAVAAAAA oligopeptides. The binding sites of miR-5-15733-3p encoded the AAAAFAVA, AAVAAAAA and AAAAAAAN octapeptides. The binding sites of miR-9-20317-3p encoded the AAAAFAVA, AAVAAAAA, AVAAAAA and VAAAAAAA

oligopeptides. Therefore, the mRNA region of *ZFH3* gene, with overlapping multiple sites, was a compact target for three miRNAs that competed with each other for the binding site. The highest value of free binding energy ($\Delta G = -129$ kJ/mole) was in miR-5-15733-3p and miR-9-20317-3p, which indicates a significant effect on the mRNA translation of the *ZFH3* gene with an equal concentration of miRNA and mRNA. The *ZFH3* protein regions encoded by the binding sites of miRNAs studied above were identical in mice and rats and differed a little from those in humans (see Supplementary table 8). While the functional role of polyAla in the *ZFH3* protein remains unknown, the 2D structure of the encoding polynucleotide in mRNA makes it easy to bind miRNA due to the small number of intramolecular interactions of the nucleotides of this mRNA region. Synonymic codons miR-12-32603-3p binding sites in mRNA of *Cca* are $GCG_6GCA_6GCC_1GCT_1$, *Hsa* – $GCG_9GCA_1GCC_1GCT_1$, *Mmu* – $GCG_2GCA_3GCC_7GCT_1$, *Ppa* – $GCG_{11}GCA_1GCC_1GCT_1$, *Rno* – $GCG_2GCA_4GCC_6GCT_1$.

Another mRNA region with the miR-1322 binding polysite encoded polyGln (Supplementary table 9). The first binding site encoded the RQQQQQ hexapeptide. In humans polyGln consisted of 19 Gln, and in rats and mice – from 14 and 13 Gln, respectively, which could affect the expression degree of the polyGln function. The miR-1322 binding sites in the mRNA of the *ZFH3* gene of all studied animal species were located between the nucleotide sequences encoding the conservative LADMIAS (from the 5'-end) and AQTLAQAAQ (from the 3'-end) oligopeptides. Only in *Xtr* polyGln Gln changed to Leu. The function of polyGln remains unknown. We assume that the polysite binds to miR-1322, so the encoded polyGln of *ZFH3* transcription factor can interact with negatively charged regions of DNA-binding proteins. Another our assumption is that the polyGln variability of *ZFH3* protein is associated with the development of several diseases, but the way it happens remains unknown (Liu et al., 2014; Martin et al., 2014; Chauhan et al., 2016; Hauer et al., 2017). Synonymic codons miR-12-32603-3p binding sites in mRNA of *Cfa* are CAA_6CAG_{21} , *Cfe* – CAA_2CAG_{20} , *Hsa* – $CAA_{13}CAG_6$, *Phu* – CAA_5CAG_{18} , *Ssc* – CAA_7CAG_{14} , *Tch* – CAA_5CAG_{14} .

The binding site of miR-11-29856-3p encoded the absolutely conservative heptapeptide TETLLQL, presented in the protein of 55 species of animals (Supplementary table 10). Absolutely conservative heptapeptide LLPHPMT adjoined the N-terminus of the heptapeptide, and the variable region of the *ZFH3* protein – the C-terminus. The high conservation of miR-11-29856-3p binding site suggested the important role of this miRNA in regulating the expression of *ZFH3* gene even in the early stages of animal evolution since its binding site is present in *Xtr*.

Supplementary table 11 presents the variability data of multiple binding sites miR-2-6184-3p, miR-5-14114-5p and miR-19-43437-5p encoding the PPPPPPP heptapeptide for an equal length. While the 5'-end of the multiple sites encoded absolutely conserved octapeptide PLRPQTPE, the LPAAPPQP octapeptide was located at the 3'-end. As far as stroke markers are concerned, it is possible to assume there is an association between miR-5-14114-5p and miR-2-6184-3p with the target gene *ZFH3* whose binding sites have the ΔG values of -123 kJ/mole and -117 kJ/mole, respectively. The functional value of polyPro is unknown. Synonymic codons

of miR-2-6184-3p, miR-5-14114-5p and miR-19-43437-5p binding sites in mRNA of *Hsa* were CCA₆CCU₃CCC₃, *Mmu* – CCA₂CCU₄CCC₃CCG₃, *Rno* – CCA₄CCU₂CCC₅CCG₁, *Xtr* – CCA₄CCU₈CCC₁.

The absolute conservativeness of the SNPLLASQ octapeptide encoded the miR-3692-5p binding site in the mRNA of *ZFHX3* gene of 57 animal species (Supplementary table 12). The 5'-end of the binding site encoded the absolutely conserved PLRPQTPE octapeptide. From the 3'-end of the SNPLLASQ octapeptide, the highly conserved octapeptide LLSGAIPQ was located in most animal species. With $\Delta G = -119$ kJ/mole and the $\Delta G/\Delta G_m$ value of 90 %, the association of miR-3692-5p with the target gene *ZFHX3* could serve as a stroke marker. MicroR-3692-5p was co-expressed with the gene of the ZDHHC14 transcription factor, which is expressed in many tissues as an oncosuppressor (Yeste-Velasco et al., 2014).

In the region from 10798 nt to 10890 nt, three binding sites of miR-1322-3p separated by codons into a RQL tripeptide and a KV dipeptide were located in the human gene mRNA (Supplementary table 13). In *ZFHX3* gene mRNA of other animal species, these miR-1322-3p binding sites differed significantly in the number of codons and in the number of encoded Gln, accordingly. For example, in the rat *ZFHX3* gene the first polysite encoded 15 Gln, the second polysite encoded 8 Gln and the third polysite – again 15 Gln. Therefore, the rat could not be an adequate model for studying diseases in which polyGln is involved in the *ZFHX3* protein. The longest polypeptide of 33 Gln was encoded by the second binding site in the *ZFHX3 Pma* mRNA.

The miR-6779-5p and miR-671-5p binding sites of the human *ZFHX3* gene mRNA overlapped with nucleotide sequences encoding the QTPVPP and PVPPGAP, oligopeptides, respectively (Supplementary table 14). Substitution of Pro for Ser, Gln, Thr or Ala in different animal species was a reflection of changes in one nucleotide in the binding site. However, the energy of miR-6779-5p and miR-671-5p interaction with the *ZFHX3* gene mRNA varied insignificantly. QTPVPPGAP-bound oligopeptides QPKAS and SPDKDPAK were highly conserved in the vast majority of species, so they probably perform a highly significant function in the *ZFHX3* protein.

Supplementary table 15 shows the variability of the amino acids encoded by the binding sites of nine miRNAs in the orthologous *ZFHX3* gene mRNA. The mRNA region located from 11193 nt to 11264 nt overlapping of the nucleotide sequences of the nine miRNA binding sites encoded polyGly with one substitution of Gly by Ser. The twelve miR-17-39416-3p binding sites encoded the GGGGGGSG, GGGGSGGG, GGSGGGGG, GSGGGGGG, SGGGGGGG octapeptides and the seven GGGGGGGG octapeptides. The binding sites in positions between 11223 nt and 11232 nt had the greatest free binding energy ΔG equal to -121 kJ/mole and the $\Delta G/\Delta G_m$ value of 92 %. Nine miR-9-20317-3p binding sites in the mRNA of the human *ZFHX3* gene encoded the GGGSGGG oligopeptide, seven GGGGGGGG oligopeptides and a GGGGGGGS oligopeptide. The two miR-1-1819-3p binding sites and one miR-6-17815-3p binding site encoded GGGGGGG. The miR-18-39953-5p and miR-2-6862-5p binding sites encoded one of the GGGGGGGG heptapeptide. MicroR-1260b had six binding sites, encoding one GGSGGG

and five GGGGGG hexapeptides. miR-5-15733-3p binding sites encoded GGGGGGGS and GGGGGSYH. Two binding sites of miR-X-48174-3p encoded oligopeptides GSGGGGGG and GGGGGGGG. Synonymic codons of miRNA binding sites in mRNA of *Cca*, *Nga* and *Lve* were used in the ratios GGC₁₅GGU₃, GGC₁₆GGU₁ and GGC₁₃GGU₃, respectively. In the third position of synonymous codons, only pyrimidines were used.

As it has been mentioned above, the miR-9-20317-3p binding site encoded the AAAAAAA oligopeptide (see Supplementary table 8). In the mRNA region from 11193 nt to 11264 nt the miR-9-20317-3p binding site encoded the GGGGGGGG oligopeptide (see Supplementary table 15). This explains why, for example, the nucleotide sequence gcgcgcgcgcgcgcgcgcgcg can be translated into three reading frames, where the first reading frame corresponds to the AAAAAAA oligopeptide, the second reading frame – to the RRRRRR oligopeptide and the third reading frame – to the GGGGGG oligopeptide. For this reason, the miR-5-15733-3p and miR-17-39416-3p binding sites in the region encoded polyAla, and in the mRNA region from 11193 nt to 11264 nt – polyGly. The assumption that a single nucleotide sequence of binding polysites can encode the oligopeptide in the three reading frames has been confirmed in the study of miR-1322-3p binding with the mRNA of 48 human genes that demonstrated the way of polyGln, polySer and polyAla were encoded by miR-1322-3p (Niyazova et al., 2015; Atambayeva et al., 2017). Synonymic codons of the miRNA binding sites in the mRNAs of *Hsa*, *Csa* and *Pab* were used in the ratios GGC₁₈GGU₂AGU₁, GGC₁₅GGU₅AGU₁ and GGC₁₆GGU₂AGU₁, respectively. In the third position of binding sites synonymic codons only pyrimidines were used. In *Cca*, *Nga* and *Lve* mRNAs were no Ser among polyGly, and synonymic codons kept the advantageous use of GGC codons: GGC₁₅GGU₃, GGC₁₆GGU₁, GGC₁₃GGU₃. In the third position of synonymous codons, only pyrimidines are used.

From 11461 nt to 11503 nt seven miRNA had one to five mRNA binding sites (see Table). Supplementary table 16 shows the variability of the amino acids encoded by the binding sites of these miRNAs. Two miR-19-21199-3p binding sites encoded the PPPPSAAAP and PPSAAAPSS nonapeptides. The miR-1-2121-3p and miR-19-33623-3p binding sites encoded the same PPPPSAAAP nonapeptide. One binding site of miR-5-14114-5p encoded the PPPPSAAA octapeptide. The miR-1-2770-3p and miR-2-6184-3p binding sites encoded the PPPPSAAA and AAPSSASP octapeptides. Three miR-3960 binding sites encoded heptapeptides PPPPSAA, PPPSAAA and PPSAAAP. The binding sites of seven miRNAs in rat and mouse mRNAs were not different from those in humans; only an Ala codon was converted into a Ser one, which had little effect on the energy of miRNA interaction with mRNA in this region, so rats and mice can serve as adequate models for studying the effect of these miRNAs on the *ZFHX3* gene expression.

The transcription factor *ZFHX3* gene is unique for several reasons. Its mRNA contains binding sites for 26 miRNAs, so its expression depends on several host genes that are co-expressed with their miRNA (Hoepfner et al., 2009; Ma et al., 2011; He et al., 2012; Li et al., 2015), or are dependent on the expression of miRNA genes that are located between protein-coding genes.

For some miRNAs in mRNA there are polysites encoding oligopeptides: polyGlu, polyAla, polyPro, polyGly, polyGln.

A mRNA contains several regions that include multiple binding sites for several miRNAs with overlapped nucleotide sequences. Most of the studied binding sites are located in the protein-coding region, which allows us to assume the function of the encoded oligopeptides. Changes in codon usage frequencies and their location in binding sites encoding oligopeptides do not significantly affect the energy of miRNA interaction with the *ZFHX3* gene mRNA. For three miRNAs there are two homologous sites separated by 8215 nt, containing miRNA binding sites. These regions encoded oligopeptides in two different reading frames corresponding to the binding sites of these miRNAs. These duplicating regions of miRNA binding sites increase the control of these miRNAs for the *ZFHX3* gene expression, which indicates that miRNA binding sites are “indifferent” to what they encode. In some cases, the encoded oligopeptides can perform the necessary function for the *ZFHX3* protein. For example, polyGlu oligopeptide can interact with positively charged DNA-binding proteins.

When selecting miRNA and mRNA associations as a marker of the disease one should meet the following conditions: (1) high binding energy of miRNA with mRNA; (2) high $\Delta G/\Delta G_m$ value; (3) the presence of multiple binding sites in mRNA for miRNA; (4) certain degree of conservatism of miRNA binding sites in orthologous gene mRNAs. On these grounds, it is proposed to use the miR-20-23817, miR-9-20317-3p, miR-19-21199-3p, miR-19-33623-3p and miR-1-2121-3p associations with the *ZFHX3* gene mRNAs as markers for the diagnosis of stroke and other diseases for which *ZFHX3* gene is the candidate gene causing their development. These miRNAs were associated with mRNA of gene with a free energy ΔG value equal to -130 kJ/mole and more.

In the experiments establishing the role of miRNA in the regulation of gene expression, it is necessary to consider the following circumstances, which in many publications are not taken into account. MicroRNAs in a complex with RISC bind to mRNA and manifest themselves as inhibitors of translation, therefore the description of their action used in biochemistry is applicable.

The miRNA interaction mRNA is determined by the physicochemical properties of these molecules. Unfortunately, in the study of this interaction, little-grounded assumptions were made that led to significant errors in the determination of miRNA binding sites in mRNA and interpretation of the obtained results. Existing programs for identification of miRNA binding sites in mRNA of target genes, unfortunately, predict many false-positive sites (Peterson et al., 2014). To increase the reliability of the predicted binding sites, we have studied orthologous genes of different animal species (Atambayeva et al., 2017).

Conclusion

The mRNA of the *ZFHX3* gene contains binding sites for 26 miRNAs. This fact indicates a strong dependence of the *ZFHX3* gene expression on miRNA. The binding sites of these miRNAs are found in the protein-coding region of the *ZFHX3* gene mRNA and encode the oligopeptides located between the conservative flanking *ZFHX3* protein oligopeptides. Identical nucleotide sequences of binding sites of one miRNA located

in different locations of mRNA encode different oligopeptides in different reading frames. The mRNA of the *ZFHX3* gene contains consecutively located binding sites for one or more miRNAs that encode oligopeptides.

The identified miRNAs can be used as a marker of disease development involving *ZFHX3* gene. The impact effectiveness of each miRNA on the expression of *ZFHX3* gene depends on the free energy of their interaction and on the ratio of miRNA concentrations, since the miRNA binding sites (RISC) coincide or overlap. In addition, the ratio of miRNA and mRNA of *ZFHX3* gene concentrations is very important. The prolonging length of the miRNA binding polysites increases the probability of the interaction of one or more miRNAs with mRNA of *ZFHX3*. The detection of miRNA binding sites in mRNA of paralogous genes allows to determine the adequacy of experimental animals for studying the diseases caused by the effect of miRNA.

Acknowledgments

We would like to thank our study individuals for their generous participation in this study. This study was supported by a grant from the Ministry of Education and Science, Kazakhstan Republic, SRI of Biology and Biotechnology Problems, al-Farabi Kazakh National University.

Conflict of interest

The authors declare to have no conflict of interest.

References

- Atambayeva S., Niyazova R., Ivashchenko A., Pyrkova A., Pinsky I., Akimniyazova A., Labeit S. The binding sites of miR-619-5p in the mRNAs of human and orthologous genes. *BMC Genomics*. 2017; 18(1):1-10. DOI 10.1186/s12864-017-3811-6.
- Chauhan G., Dabette S. Genetic risk factors for ischemic and hemorrhagic stroke. *Curr. Cardiol. Rep.* 2016;18(12):1-11. DOI 10.1007/s11886-016-0804-z.
- Chen Y., Song Y., Huang J., Qu M., Zhang Y., Geng J., Zhang Z., Liu J., Yang G.Y. Increased circulating exosomal miRNA-223 is associated with acute ischemic stroke. *Front. Neurol.* 2017;8:57. DOI 10.3389/fneur.2017.00057.
- Dhiraj D., Chrysanthou E., Mallucci G., Bushell M. miRNAs-19b, -29b-2* and -339-5p show an early and sustained up-regulation in ischemic models of stroke. *PLoS One*. 2013;8(12):e83717. DOI 10.1371/journal.pone.0083717.
- Hauer A., Pulit S., van den Berg L., de Bakker P., Veldink J., Ruigrok Y. A replication study of genetic risk loci for ischemic stroke in a Dutch population: a case-control study. *Sci. Rep.* 2017;7(1):1-5. DOI 10.1038/s41598-017-07404-4.
- He C., Li Z., Chen P., Huang H., Hurst L., Chen J. Young intragenic miRNAs are less coexpressed with host genes than old ones: Implications of miRNA host gene coevolution. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40(9):4002-4012. DOI 10.1093/nar/gkr1312.
- Hoepfner M., White S., Jeffares D., Poole A. Evolutionarily stable association of intronic snoRNAs and microRNAs with their host genes. *Genome Biol. Evol.* 2009;1:420-428. DOI 10.1093/gbe/evp045.
- Inose Y., Kato Y., Kitagawa K., Uchiyama S., Shibata N. Activated microglia in ischemic stroke penumbra upregulate MCP-1 and CCR2 expression in response to lysophosphatidylcholine derived from adjacent neurons and astrocytes. *Neuropathology*. 2015;35(3):209-223. DOI 10.1111/neup.12182.
- Ivashchenko A., Berillo O., Pyrkova A., Niyazova R., Atambayeva Sh. MiR-3960 binding sites with mRNA of human genes. *Bioinformation*. 2014;10(7):423-427. DOI 10.6026/97320630010423.
- Ivashchenko A., Issabekova A., Berillo O. miR-1279, miR-548j, miR-548m, and miR-548d-5p binding sites in CDSs of paralogous and

- orthologous *PTPN12*, *MSH6*, and *ZEB1* genes. Biomed. Res. Int. 2013;2013:1-11. DOI 10.1155/2013/902467.
- Ji Q., Ji Y., Peng J., Zhou X., Chen X., Zhao H., Xu T., Chen L., Xu Y. Increased brain-specific MiR-9 and MiR-124 in the serum exosomes of acute ischemic stroke patients. PLoS One. 2016;11(9):1-14. DOI 10.1371/journal.pone.0163645.
- Kurzepa J., Kurzepa J., Golab P., Czerska S., Bielewicz J. The significance of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in the ischemic stroke. Int. J. Neurosci. 2014;124(10):707-716. DOI 10.3109/00207454.2013.872102.
- Li N., Yang J., Cui L., Ma N., Zhang L., Hao L. Expression of intronic miRNAs and their host gene *Igf2* in a murine unilateral ureteral obstruction model. Braz J. Med. Biol. Res. 2015;48(6):486-492. DOI 10.1590/1414-431X20143958.
- Liang T.Y., Lou J.Y. Increased expression of mir-34a-5p and clinical association in acute ischemic stroke patients and in a rat model. Med. Sci. Monit. 2016;22:2950-2955. DOI 10.12659/MSM.900237.
- Liu Y., Ni B., Lin Y., Chen X.G., Fang Z., Zhao L., Hu Z., Zhang F. Genetic polymorphisms in *ZFHX3* are associated with atrial fibrillation in a Chinese Han population. PLoS One. 2014;9(7):101318. DOI 10.1371/journal.pone.0101318.
- Londin E., Loher P., Telonis A.G., Quann K., Clark P., Jing Y., Hatzimichael E., Kirino Y., Honda S., Lally M., Ramratnam B., Comstock C.E.S., Knudsen K.E., Gomella L., Spaeth G.L., Hark L., Katz L.J., Witkiewicz A., Rostami A., Jimenez S.A., Hollingsworth M.A., Yeh J.J., Shaw C.A., McKenzie S.E., Bray P., Nelson P.T., Zupo S., Roosbroeck K.V., Keating M.J., Calin G.A., Yeo C., Jimbo M., Cozzitorto J., Brody J.R., Delgrosso K., Mattick J.S., Fortina P., Rigoutsos I. Analysis of 13 cell types reveals evidence for the expression of numerous novel primate- and tissue-specific microRNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2015;112(10):1106-1115. DOI 10.1073/pnas.1420955112.
- Ma N., Wang X., Qiao Y., Li F., Hui Y., Zou C., Jin J., Lv G., Peng Y., Wang L., Huang H., Zhou L., Zheng X., Gao X. Coexpression of an intronic microRNA and its host gene reveals a potential role for miR-483-5p as an IGF2 partner. Mol. Cell. Endocrinol. 2011;333(1):96-101. DOI 10.1016/j.mce.2010.11.027.
- Martin R., Owens W., Cunningham M., Mayosi B., Koref M., Kevavney B. Chromosome 16q22 variants in a region associated with cardiovascular phenotypes correlate with *ZFHX3* expression in a transcript-specific manner. BMC Genet. 2014;15:1-7. DOI 10.1186/s12863-014-0136-1.
- Mineharu Y., Inoue K., Inoue S., Yamada S., Nozaki K., Takenaka K., Hashimoto N., Koizumi A. Association analysis of common variants of *ELN*, *NOS2A*, *APOE* and *ACE2* to intracranial aneurysm. Stroke. 2006;37(5):1189-1194. DOI 10.1161/01.STR.0000217408.91389.4d.
- Niyazova R., Berillo O., Atambayeva Sh., Pyrkova A., Alybaeva A., Ivashchenko A. miR-1322 binding sites in paralogous and orthologous genes. Biomed. Res. Int. 2015: 962637. DOI 10.1155/2015/962637.
- Peterson S., Thompson J., Ufkin M., Sathyanarayana P., Liaw L., Congdon C. Common features of microRNA target prediction tools. Front. Genet. 2014;5:1-10. DOI 10.3389/fgene.2014.00023.
- Qingfeng M., Haiping Zh., Zhen T., Rongliang W., Ping L., Ziping H., Shubei M., Yumin L., Jianping J. MicroRNA-181c exacerbates brain injury in acute ischemic stroke aging and disease. Aging Dis. 2016;7(6):705-714. DOI 10.14336/AD.2016.0320.
- Sobczak K., Michlewski G., de Mezer M., Kierzek E., Krol J., Olejniczak M., Kierzek R., Krzyzosiak W. Structural diversity of triplet repeat RNAs. J. Biol. Chem. 2010;285(17):12755-12764. DOI 10.1074/jbc.M109.078790.
- Wu Q., Wu H., Orlov Yu.L., Gegentana G., Huo W., Bragin A.O., Wu N., Suyalatu S., Zhao F., Zhao J., Tabikhanova L.E., Chen M., Bai H. Genetic polymorphisms and related risk factors of ischemic stroke in a Mongolian population in China. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(5):581-587. DOI 10.18699/VJ17.275.
- Yeste-Velasco M., Mao X., Grose R., Kudahetti S., Lin D., Marzec J., Vasiljević N., Chaplin T., Xue L., Xu M., Foster J., Karnam S., James S., Chioni A., Gould D., Lorincz A., Oliver R., Chelala C., Thomas G., Shipley J., Mather S., Berney D., Young B., Lu Y. Identification of *ZDHC14* as a novel human tumour suppressor gene. J. Pathol. 2014;232(5):566-577. DOI 10.1002/path.4327.



Association between polymorphisms in genes encoding 2'-5'-oligoadenylate synthetases and the humoral immune response upon vaccination against tick-borne encephalitis

N.S. Yudin^{1, 2, 3}✉, A.V. Igoshin¹, S.L. Lutova⁴, Ya. Gon², M.I. Voevoda^{1, 2, 3}, V.A. Belyavskaya⁵

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

⁴ State Budgetary Health Care Institution of the Novosibirsk Region "City Hospital № 14", Novosibirsk, Russia

⁵ State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" of the Federal Service for Surveillance in Consumer Rights Protection and Human Well-being, Novosibirsk region, Koltsovo, Russia

Vaccination forms active immunity and represents an effective way of preventing tick-borne encephalitis (TBE). However, excessive vaccination is unjustified in terms of economics and medical ethics. One of the individualized approaches to vaccines is the selection of vaccine doses depending on the expected levels of immune response. Therefore, there is a need for new methods for assessing potential human immune responses prior to vaccination. The aim of this study was to determine possible association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) located within OAS2 and OAS3 genes, which have been previously associated with the development of severe forms of TBE, and the formation of antibodies and cytokines upon vaccination against TBE. The study involved 97 volunteers of both sexes who had not previously been vaccinated against TBE and had no contact with ticks. Venous blood samples were collected one month after vaccination against TBE using the EnceVir vaccine. Levels of specific IgG antibodies against tick-borne encephalitis virus and interleukin 4 (IL-4) were analyzed. Genomic DNA samples were genotyped for the SNPs rs2285932, rs2072136, rs1293762, rs15895 and rs1732778 in genes encoding 2'-5'-oligoadenylate synthetases OAS2 and OAS3. Antibody production in response to vaccine administration was significantly associated with SNP rs1732778 in the regulatory region of the OAS2 gene. This indicator was significantly higher in people with heterozygous genotypes G/A as compared to people with homozygous genotypes G/G and A/A. Carriers of the A allele (G/A or A/A genotypes) of the same SNP had reduced IL-4 levels as compared to the homozygous G/G individuals. Thus, the data obtained indicate that SNP rs1732778 in the regulatory region of the OAS2 gene correlates with the formation of antiviral IgG antibodies and changes in IL-4 levels upon vaccination. Evidently, the genetic polymorphism in OAS2 gene should be considered when performing individualized TBE vaccinations.

Key words: tick-borne encephalitis; vaccination; IgG antibodies; gene; OAS2; OAS3; single nucleotide polymorphism; association.

Ассоциация полиморфизма генов 2'-5'-олигоаденилатсинтетаз с уровнем гуморального иммунного ответа после вакцинации против клещевого энцефалита

N.S. Yudin^{1, 2, 3}✉, A.V. Igoshin¹, S.L. Lutova⁴, Ya. Gon², M.I. Voevoda^{1, 2, 3}, V.A. Belyavskaya⁵

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

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Федерального исследовательского центра Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁴ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Новосибирской области «Городская поликлиника № 14», Новосибирск, Россия

⁵ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Новосибирская область, р. п. Кольцово, Россия

Вакцинация является эффективным средством профилактики клещевого энцефалита, формирующим активный иммунитет. Однако избыточная иммунизация при вакцинации неоправдана с точки зрения экономики и медицинской этики. Одним из подходов к индивидуализации вакцинации может быть подбор доз вакцины в зависимости от ожидаемого уровня иммунного ответа пациента. Поэтому возникает необходимость разработки методов оценки потенциального уровня иммунологических реакций человека до проведения вакцинации. Цель работы – поиск возможных ассоциаций однонуклеотидных полиморфных маркеров (ОНП) в генах OAS2 и OAS3, для которых ранее была найдена корреляция с развитием тяжелых форм клещевого энцефалита, а также с образованием антител и цитокинов после вакцинации против клещевого энцефалита. В исследовании приняли участие 97 добровольцев обоего пола, ранее не вакцинированных и не имевших контактов с клещами. Через один месяц после иммунизации вакциной «ЭнцеВир» у них брали пробы венозной крови. Анализировали уровни специфических антител IgG против вируса клещевого энцефалита и интерлейкина 4 (ИЛ-4). Генотипировали



ОНП rs2285932, rs2072136, rs1293762, rs15895 и rs1732778 в генах 2'-5'-олигоаденилатсинтетаз *OAS2* и *OAS3*. Выработка антител в ответ на введение вакцины была достоверно ассоциирована с ОНП rs1732778 в регуляторном районе гена *OAS2*. Этот показатель оказался существенно выше у людей с гетерозиготным генотипом G/A, чем у субъектов с гомозиготными генотипами G/G и A/A. Индивиды-носители аллеля A в составе генотипов G/A и A/A этого же ОНП имели сниженный уровень ИЛ-4 по сравнению с гомозиготными индивидами G/G. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что ОНП rs1732778 в регуляторной области гена *OAS2* ассоциирован с образованием противовирусных антител IgG и уровнем ИЛ-4 после вакцинации. По-видимому, генетический полиморфизм в гене *OAS2* следует принимать во внимание при индивидуализации вакцинопрофилактики клещевого энцефалита.

Ключевые слова: клещевой энцефалит; вакцинация; IgG антитела; ген; *OAS2*; *OAS3*; однонуклеотидный полиморфизм; ассоциация.

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Yudin N.S., Igoshin A.V., Lutova S.L., Gon Ya., Voevoda M.I., Belyavskaya V.A. Association between polymorphisms in genes encoding 2'-5'-oligoadenylate synthetases and the humoral immune response upon vaccination against tick-borne encephalitis. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(4):445-451. DOI 10.18699/VJ18.381

Tick-borne encephalitis (TBE) is a natural focal viral infection that manifests as fever, intoxication and damage to the gray matter of the brain (encephalitis) and/or meninges (meningitis and meningoencephalitis) (Ierusalimsky, 2001). The disease can lead to long-lasting neurological and psychiatric complicating disorders or even death of the infected patient. TBE agent is the RNA-containing virus (TBEV) of the family Flaviviridae. The main vectors of disease and natural reservoir for the agent to survive are scale ticks *Ixodes persulcatus* and *Ixodes ricinus*. The cases are being detected more and more often in new areas as the evidence of the virus migration (Valarcher et al., 2015). Vaccination is the efficient way of preventing TBE by active immunity forming (Bilalova, 2009). Constant growth of people mobility and intensification of migration process make vaccination more and more urgent.

As new information is accumulated on immune response development mechanisms, its prediction and potential side effects, the differentiated approach towards preventive, or so called individualized vaccination, becomes actual (Medunitsin, 2004). Individualized vaccination aims to create necessary immune protection for the organism avoiding excessive immunization, which is unjustified and inappropriate in terms of economics and medical ethics. One of the individualized approaches is the vaccine dose selection depending on its potency, vaccination process stage and the expected levels of immune response. Thus, the methods should be developed to assess the potential human immune responses prior to vaccination.

Individual variability of antibodies formation and long-term post-vaccinal presence is mainly determined by the inherited peculiarities of cell-mediated and humoral immunity, type of the vaccine, vaccination schedule and some environmental factors, like nutrition (Poland et al., 2008). Genes to encode the immune system proteins and DNA regulatory regions near them comprise a large number of single nucleotide polymorphisms (SNPs) (Poland et al., 2011). In the main

complex of histocompatibility genes, cytokine genes and their receptors, SNPs have been established to correlate with the individual immune response (or its absence) to the vaccination (Linnik, Egli, 2016).

2'-5'-oligoadenylate synthetase protein family (*OAS*) are important factors of innate antiviral immunity. In humans, there are known four genes encoding the proteins of this family. They are *OAS1*, *OAS2* and *OAS3* located as a cluster in q24 region of the chromosome 12 and *OASL* localized in chromosome 12. In the cell, *OAS1*, *OAS2* and *OAS3* proteins are in monomeric form. dsRNA of the virus causes activation of enzymes which use ATP as a substrate and catalyze AMP polymerization producing 2'-5'-oligoadenylates. Their reaction with latent endoribonuclease L leads to its dimerization and activation, thus to both cell RNA and vRNA degradation and consequently, virus reproduction is suppressed. mRNA transcription of the *OAS* family genes is induced by interferons (Hovanessian, Justesen, 2007; Kristiansen et al., 2011; Yudin et al., 2018).

In groups with severe TBE cases (central nervous system damages as meningo-encephalitic form of the disease) and milder ones without central nervous system damages (meningeal form, fever) and/or population control, analysis of 23 SNPs within *OAS1*, *OAS2*, *OAS3* and *OASL* genes has previously revealed statistically significant distinction between genotype, allele and/or haplotype frequencies by five SNPs; those were rs1293762 (intron2), rs15895 (3'-UTR), rs1732778 (3'-flanking region) of *OAS2* genes and rs2285932 (exon6, Ile438Ile), rs2072136 (exon8, Ser567Ser) of *OAS3* genes (Barkhash et al., 2010). SNPs within the genes of *OAS* family are associated with susceptibility to other diseases caused by flaviviruses, such as West Nile fever (Yakub et al., 2005; Lim et al., 2009; Bigham et al., 2011; Danial-Farran et al., 2015) and Dengue fever (Alagarasu et al., 2013; Thamizhmani, Vijayachari, 2014), or with the response to the hepatitis C antiviral interferon therapy (Imran et al., 2014). I.H. Haralambieva et al. (2010) established the association

of 23 SNPs in the *OAS* cluster with the level of antibodies and interleukin-4, interleukin-6 and interleukin-10 secretion upon rubella vaccination.

The study targets to determine possible association between SNPs located within *OAS2* and *OAS3* genes being previously associated with the development of severe forms of TBE, and the formation of antibodies and cytokines upon vaccination against TBE.

Materials and methods

The study involved 97 volunteers (56 men and 41 women) aged from 15 to 30 years old (median age 26) who had not previously been vaccinated against TBE and had no contact with ticks recorded in their surveys. The EnceVir vaccine against TBE (SPA “Microgen”, Tomsk) was used for vaccination. It is a purified concentrated sterile suspense of inactivated by formalin and aluminum hydroxide adsorbed TBE virus grown in suspension culture of chicken embryos. Vaccination was performed according to the scheme proposed by the manufacturer. Venous blood samples were collected one month upon the vaccination. The project was approved by the ethics committee of the Research Institute of Internal and Preventive Medicine, the branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics SB RAS. The informed consent to participate in the investigation was received from all the patients.

Levels of specific IgG antibodies against tick-borne encephalitis virus (TBEV) and interleukin 4 (IL-4) were analyzed by immune-enzyme assay using test-systems VectoTBE-IgG-strip and Interleukin-4-IEA-BEST (JSC “Vector-Best”, Koltzovo, Novosibirsk region).

The genomic DNA was isolated by peripheral blood proteolysis followed by phenol extraction (Sambrook, Russel, 2006). Genotyping for the SNPs rs2285932, rs2072136, rs1293762, rs15895 and rs1732778 in genes encoding 2'-5' -oligoadenylate synthetases *OAS2* and *OAS3* was performed in accordance with techniques proposed by A.V. Barkhash et al. (2010). Genotype deviation of distribution from Hardy – Weinberg equilibrium was determined by Hardy – Weinberg equilibrium calculator (<http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>).

The Kolmogorov–Smirnov test was used to assess the distribution normality of the traits under the study. As the distribution of the characteristics was not normal, the medians were calculated and 25–75 % quartiles in the groups being compared. The gender effect was assessed by Mann-Whitney *U* test. Gender turned not to affect the analyzed traits significantly and it was not further taken into account. For genotype effect assessment, general linear model was used. For statistical analysis of the dependent variable (specific IgG antibodies level), logarithmic transformation to normality was applied. Our earlier study of the same sample has established the certain influence of the age on this indicator (Lutova et al., 2016). Thus for the model, genotype was taken as a fixed factor, while age as a covariate. Paired comparison was made by post hoc analysis, *F*-test being applied. Critical value of statistical significance for null hypothesis was taken as 0.05. For the data treatment the software package STATISTICA 8.0 was used.

Results

We have registered the protective immune response against TBE in 85.8 % of women and 86.3 % of men, the IgG level being > 100 IU/ml. Analogous results were earlier obtained by other researchers while performing preventive vaccination of adult population (Bilalova, 2009). In all the individuals involved, IL-4 level was found to be within the range (0.37–25.95 mg/ml) testifying the normal course of the vaccination process (JSC “Vector-Best”, 2017).

In all the 97 samples, SNPs within the analyzed genes were genotyped successfully, but for rs2072136, rs1293762 and rs15895 being not revealed in one sample. Aside from rs1732778 ($p < 0.05$), there was no significant deviation of genotype distribution from Hardy–Weinberg equilibrium for all SNPs. For rare alleles, the frequencies were as follows: 0.309 for SNP rs2285932 in *OAS3* (T allele); 0.313 for SNP rs2072136 in *OAS3* (A allele); 0.411 for SNP rs1293762 in *OAS2* (T allele); 0.302 for SNP rs15895 in *OAS2* (A allele) и 0.361 for SNP rs1732778 in *OAS2* genes (A allele). Those results are in agreement with the frequencies of the involved alleles being previously revealed in the population of Novosibirsk: 0.251, 0.294, 0.420, 0.281 and 0.273, correspondingly (Barkhash et al., 2010).

The results of analysis of SNPs in genes encoding 2'-5'-oligoadenylate synthetases association with IgG against TBEV and IL-4 levels are presented in Table. Antibody production in response to vaccination was significantly associated with SNP rs1732778 in the regulatory region of the *OAS2* gene ($p < 0.05$). In people with heterozygous genotypes G/A, this indicator appeared to be significantly higher by comparison to people with homozygous genotypes G/G and A/A ($p < 0.01$). Carriers of the A allele (G/A or A/A genotypes) of the same SNP had a reduced IL-4 levels as compared to the homozygous G/G individuals ($p < 0.004$). Moreover, the distinctions held true upon application of Bonferroni correction for multiple comparisons. SNP rs15895 association with IL-4 titers can be considered as a tendency ($p < 0.06$). However, paired comparisons revealed the individuals with the homozygous A/A genotype to have significantly reduced IL-4 as opposed to the carriers of the G allele ($p < 0.04$).

Discussion

Immune response upon vaccination is affected by numerous factors including individual genetic peculiarities. To work out the individual approach to preventive vaccination, it is essential to identify the genetic markers which control the immune response development (Medunitsin, 2004). Specific antibody production upon the vaccine administration is significantly governed by the genes encoding the main histocompatibility complex proteins, genes of cytokines and their receptors and of Toll-like receptors and others (Linnik, Egli, 2016). However, genetic factors mediating the immune response to vaccination against the flaviviral infections remain hardly studied. There is only one published case of vaccine-associated viscerotropic disease in 64-years old patient with mutations in *CCR5* chemokine receptor and its ligand RANTES genes after administration of the attenuated vaccine against yellow fever (Pulendran et al., 2008). In the sample involved in the present paper, deletion in the *CCR5* gene was earlier shown to offer promise as a potential marker of

Association of SNPs in genes encoding 2'-5'-oligoadenylate synthetases with levels of specific IgG antibodies against TBEV (IU/ml) and IL-4 (mg/ml) upon vaccination against tick-borne encephalitis

Gene	Position	Region	SNP	Genotype	Median*	25–75 % quartiles	<i>p</i> **
IgG							
OAS3	112 949 145	Exon 6, p.Ile438Ile	rs2285932	C/C (<i>n</i> = 44)	221.5	156.0–260.0	0.846
				C/T (<i>n</i> = 46)	219.0	101.0–260.0	
				T/T (<i>n</i> = 7)	210.0	81.0–260.0	
OAS3	112 961 114	Exon 8, p.Ser567Ser	rs2072136	G/G (<i>n</i> = 43)	210.0	121.0–260.0	0.988
				G/A (<i>n</i> = 46)	227.5	101.0–260.0	
				A/A (<i>n</i> = 7)	216.0	39.0–260.0	
OAS2	112 993 031	Intron 2	rs1293762	G/G (<i>n</i> = 35)	191.0	71.0–245.0	0.412
				G/T (<i>n</i> = 43)	237.0	145.0–260.0	
				T/T (<i>n</i> = 18)	199.0	94.0–238.0	
OAS2	113 010 483	Exon 10, p.Ter720Trp	rs15895	G/G (<i>n</i> = 48)	198.0	110.5–255.0	0.859
				G/A (<i>n</i> = 38)	236.0	101.0–260.0	
				A/A (<i>n</i> = 10)	199.0	136.0–243.0	
OAS2	113 019 120	3′-region, 7 397 bp	rs1732778	G/G (<i>n</i> = 35)	191.0 ^a	90.0–260.0	0.047
				G/A (<i>n</i> = 54)	235.5 ^b	169.0–260.0	
				A/A (<i>n</i> = 8)	112.0 ^a	31.0–201.0	
IL-4							
OAS3	112 949 145	Exon 6, p.Ile438Ile	rs2285932	C/C (<i>n</i> = 40)	9.89	4.47–15.65	0.835
				C/T (<i>n</i> = 40)	10.06	5.36–15.21	
				T/T (<i>n</i> = 5)	7.76	5.83–12.58	
OAS3	112 961 114	Exon 8, p.Ser567Ser	rs2072136	G/G (<i>n</i> = 37)	11.16	6.04–15.78	0.605
				G/A (<i>n</i> = 40)	8.31	4.35–14.84	
				A/A (<i>n</i> = 7)	10.0	4.56–14.28	
OAS2	112 993 031	Intron 2	rs1293762	G/G (<i>n</i> = 32)	9.21	5.83–15.21	0.926
				G/T (<i>n</i> = 38)	10.52	4.39–14.40	
				T/T (<i>n</i> = 14)	8.04	4.82–16.67	
OAS2	113 010 483	Exon 10, p.Ter720Trp	rs15895	G/G (<i>n</i> = 43)	8.42 ^a	4.39–14.28	0.061
				G/A (<i>n</i> = 33)	13.67 ^a	8.09–16.67	
				A/A <i>n</i> = 8)	6.80 ^b	4.69–9.39	
OAS2	113 019 120	3′-region, 7 397 bp	rs1732778	G/G (<i>n</i> = 25)	14.40 ^a	7.76–16.80	0.004
				G/A (<i>n</i> = 53)	8.42 ^b	4.56–12.46	
				A/A (<i>n</i> = 7)	4.56 ^b	3.36–12.58	

* The same letters of superscripts indicate absence of significant differences between medians for different genotype according to post hoc analysis by *F*-test.
** Significance of SNP genotypes influences assessment by general linear model.

successful vaccination against TBE in the Russian population of West Siberia (Lutova et al., 2016).

This paper presents the investigations of polymorphisms in five SNPs located within *OAS2* and *OAS3* genes, which have previously been associated with the development of severe forms of TBE (Barkhash et al., 2010). To our knowledge, this is the first study on the influence of SNP loci in genes encoding 2'-5'-oligoadenylate synthetases on the specific antibody production upon vaccination against TBE. To eliminate possible influence of foreign genetic and environmental factors, the sample was formed mainly of young Russian volunteers, who had not previously been vaccinated against TBE and had no contact with ticks though having lived in the endemic TBE region over a long period.

The frequencies of rare SNP alleles under the study correspond well to those alleles frequencies previously revealed in the Russian population of Novosibirsk (Barkhash et al., 2010). The significant deviation of genotype distribution from Hardy–Weinberg equilibrium was observed only for SNP rs1732778 within the *OAS2* gene. Other researchers also noted the deviation of genotype distribution for SNPs rs1732778, rs2285932 and rs2072136 in the samples of Novosibirsk Russian residents with different forms of TBE (Barkhash et al., 2010). Hence, the reason of the deviation of SNP rs1732778 genotype distribution from Hardy–Weinberg equilibrium may be explained not by genotyping errors, but panmixia absence within the analyzed population, though the population stratification or the influence of selection should not be excluded either. It is notable that studying in seven ethnic groups of Northern Eurasia has detected the lowest frequencies of the G/G genotype for SNP rs2072136 within *OAS3* gene (the gene associated with predisposition to severe forms of TBE development) in the Altaians, Khakasses, Tuvians and Shorians who probably have intensive contacts with ticks in the places of residence (Barkhash et al., 2010). The authors suggested that the tick-borne encephalitis virus might have become the selection factor of certain variations of *OAS* genes in Central Asia mongoloid people.

We have established the association of SNP rs1732778 in *OAS2* gene with the level of IgG upon vaccination against TBE (see Table). Antibody levels in individuals with the G/A heterozygous genotype were significantly higher in comparison to the ones with the homozygous genotypes G/G or A/A. Such superiority of heterozygotes over homozygotes can be observed rather often. For example, cellular immune response to the pertussis toxin and filamentous hemagglutinin was superior in the carriers of the A/G genotype of SNP rs1800896 in the *IL-10* gene promoter in comparison to the one of the individuals with G/G or A/A genotypes (Gröndahl-Yli-Hannuksela et al., 2016). We have found the only published paper aiming to investigate the role of *OAS* genes in the immune response development upon vaccination. I.H. Haralambieva with colleagues (2010) demonstrated that minor alleles of SNPs rs1732778 and rs2464288 located within the *OAS2* gene are related to the higher level of specific antibodies upon rubella immunization. SNP rs1732778 is associated with sensibility to the flaviviral diseases: TBE (Barkhash et al., 2010) and Dengue fever (Alagarasu et al., 2013; Thamizhmani, Vijayachari, 2014). It should be pointed that SNP rs1732778 is located at a distance of 7397

bp from the 3'-region of the *OAS2* gene (UCSC Genome Browser Gateway, 2017). It is not inconceivable that not this SNP directly affects the trait, but the other one, which is in linkage disequilibrium. In the chromosome 12 region of about $\pm 250,000$ bp, 11 genes are located in the vicinity of rs1732778 (*RPH3A*, *OAS1*, *OAS2*, *OAS3*, *DTX1*, *RASAL1*, *CFAP73*, *DOX54*, *RITAI*, *IQCD*, *TPCNI*). However, only three of them (namely, the genes encoding 2'-5'-oligoadenylate synthetases *OAS1*, *OAS2* and *OAS3*) participate in the immune response controlling.

Our investigations have established that SNP rs1732778 located within *OAS2* gene is significantly associated with the IL-4 level upon vaccination against TBE. The result is intensified, as association between the IL-4 level and SNP rs15895, which is located in exon 10 of *OAS2* gene at a distance of 8637 bp from SNP rs1732778 has also appeared to be a tendency (see Table). IL-4 is an important regulatory cytokine which is produced by mast cells, Th2 cells, eosinophils and basophils (Gadani et al., 2012). IL-4 controls Th2-type cellular immunity activation (Zamorano et al., 2003), IgE production and secretion by B cells (Geha et al., 2003) and the alternative activation of macrophages, which differs from usual anti-inflammatory activation (Gordon, 2003). As the IL-4 level upon rubella vaccination is extremely low, other scientists did not reveal any SNP associations within *OAS* gene cluster (Haralambieva et al., 2010). The role of IL-4 in humoral immune response development has not been clarified yet. It can be assumed that innate antiviral immunity, which is regulated by *OAS* family genes, is involved to lymphocyte stimulation control thus modeling the structure and amplitude of specific (adaptive) response to the inactivated-virus vaccine.

This proposal is confirmed by the results of several investigations. Of all the *OAS* gene family in humans, *OAS2* has the highest level of induction by interferons (Sanda et al., 2006). By a proteomics approach the direct physical interaction between *OAS2* and *NOD2* proteins was shown in THP-1 human cell line (Dugan et al., 2009). *NOD2* protein is a member of Nod1/Apaf-1 family; being expressed in leucocytes of the peripheral blood it plays an important role in the immune response to bacterial lipopolysaccharides as it binds to bacterial muramyl dipeptide and activates NF κ B protein (Ogura et al., 2001). *NOD2* protein may probably participate in the innate antiviral immunity formation. Another protein from NOD-like receptor family, NLRP3 is known to be capable to interact with influenza A virus (Allen et al., 2009).

Thus, the results we have obtained testify the fact that SNP rs1732778 located in the regulatory region of the *OAS2* gene is associated with antiviral IgG antibodies and with the IL-4 level upon vaccination against tick-borne encephalitis. Genetic polymorphism in the *OAS2* gene should probably be taken into consideration to perform individualized preventive vaccination against this disease. However, due to the limited sample size, the results from the study should be interpreted with caution. Further investigations are needed to confirm those associations for large independent population samples and to analyze the mechanisms of the influence of polymorphisms in genes encoding 2'-5'-oligoadenylate synthetases on the immune response to vaccination against flaviviral diseases.

Acknowledgements

This work was supported by Russian Science Foundation grant (project 16-15-00127).

Conflict of interest

Authors state the absence of conflict of interest.

References

- Alagarasu K., Honap T., Damle I.M., Mulay A.P., Shah P.S., Cecilia D. Polymorphisms in the oligoadenylate synthetase gene cluster and its association with clinical outcomes of dengue virus infection. *Infect. Genet. Evol.* 2013;14:390-395. DOI 10.1016/j.meegid.2012.12.021.
- Allen I.C., Scull M.A., Moore C.B., Holl E.K., McElvania-TeKippe E., Taxman D.J., Guthrie E.H., Pickles R.J., Ting J.P. The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity*. 2009;30:556-565.
- Barkhash A.V., Babenko V.N., Kobzev V.F., Romashchenko A.G., Voevoda M.I. Polymorphism in the human 2'-5'-oligoadenylate synthetase genes (OAS), associated with predisposition to severe forms of tick-borne encephalitis, in populations from North Eurasia. *Molekulyarnaya Biologiya = Molecular Biology (Moscow)*. 2010;44:985-993. (in Russian)
- Barkhash A.V., Pereygin A.A., Babenko V.N., Myasnikova N.G., Pilipenko P.I., Romashchenko A.G., Voevoda M.I., Brinton M.A. Variability in the 2'-5'-oligoadenylate synthetase gene cluster is associated with human predisposition to tick-borne encephalitis virus-induced disease. *J. Infect. Dis.* 2010;202(12):1813-1818. DOI 10.1086/657418.
- Bigham A.W., Buckingham K.J., Husain S., Emond M.J., Bofferd K.M., Gildersleeve H., Rutherford A., Astakhova N.M., Pereygin A.A., Busch M.P., Murray K.O., Sejvar J.J., Green S., Kriesel J., Brinton M.A., Bamshad M. Host genetic risk factors for West Nile virus infection and disease progression. *PLoS One*. 2011;6(9):e24745. DOI 10.1371/journal.pone.0024745.
- Bilalova G.P. Issues of the practical use of Encevir vaccine. *Sibirskiy Meditsinskiy Zhurnal = Siberian Medical Journal*. 2009;2:86-91. (in Russian)
- Daniel-Farran N., Eghbaria S., Schwartz N., Kra-Oz Z., Bisharat N. Genetic variants associated with susceptibility of Ashkenazi Jews to West Nile virus infection. *Epidemiol. Infect.* 2015;143:857-863. DOI 10.1017/S0950268814001290.
- Dugan J.W., Albor A., David L., Fowlkes J., Blackledge M.T., Martin T.M., Planck S.R., Rosenzweig H.L., Rosenbaum J.T., Davey M.P. Nucleotide oligomerization domain-2 interacts with 2'-5'-oligoadenylate synthetase type 2 and enhances RNase-L function in THP-1 cells. *Mol. Immunol.* 2009;47(2-3):560-566. DOI 10.1016/j.molimm.2009.09.025.
- Gadani S.P., Cronk J.C., Norris G.T., Kipnis J. IL-4 in the brain: a cytokine to remember. *J. Immunol.* 2012;189:4213-4219. DOI 10.4049/jimmunol.1202246.
- Geha R.S., Jabara H.H., Brodeur S.R. The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat. Rev. Immunol.* 2003;3:721-732.
- Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 2003;3:23-35.
- Gröndahl-Yli-Hannuksela K., Vahlberg T., Ilonen J., Mertsola J., He Q. Polymorphism of IL-10 gene promoter region: association with T cell proliferative responses after acellular pertussis vaccination in adults. *Immunogenetics*. 2016;68:733-741. DOI 10.1007/s00251-016-0923-0.
- Haralambieva I.H., Dhiman N., Ovsyannikova I.G., Vierkant R.A., Pankratz V.S., Jacobson R.M., Poland G.A. 2'-5'-Oligoadenylate synthetase single-nucleotide polymorphisms and haplotypes are associated with variations in immune responses to rubella vaccine. *Hum. Immunol.* 2010;71:383-391. DOI 10.1016/j.humimm.2010.01.004.
- Hovanessian A.G., Justesen J. The human 2'-5'-oligoadenylate synthetase family: unique interferon-inducible enzymes catalyzing 2'-5' instead of 3'-5' phosphodiester bond formation. *Biochimie*. 2007;89:779-788.
- Ierusalimsky A.P. Tick-Borne Encephalitis: Manual for Physicians. Novosibirsk: State Medical Academy Publ., 2001. (in Russian)
- Imran M., Manzoor S., Khattak N.M., Tariq M., Khalid M., Javed F., Bhatti S. Correlation of OAS1 gene polymorphism at exon 7 splice acceptor site with interferon-based therapy of HCV infection in Pakistan. *Viral Immunol.* 2014;27:105-111. DOI 10.1089/vim.2013.0107.
- Kristiansen H., Gad H.H., Eskildsen-Larsen S., Despres P., Hartmann R. The oligoadenylate synthetase family: an ancient protein family with multiple antiviral activities. *J. Interferon Cytokine Res.* 2011;31:41-47. DOI 10.1089/jir.2010.0107.
- Lim J.K., Lisco A., McDermott D.H., Huynh L., Ward J.M., Johnson B., Johnson H., Pape J., Foster G.A., Krysztos D., Follmann D., Stramer S.L., Margolis L.B., Murphy P.M. Genetic variation in OAS1 is a risk factor for initial infection with West Nile virus in man. *PLoS Pathog.* 2009;5:e1000321. DOI 10.1371/journal.ppat.1000321.
- Linnik J.E., Egli A. Impact of host genetic polymorphisms on vaccine induced antibody response. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2016;12:907-915. DOI 10.1080/21645515.2015.1119345.
- Lutova S.L., Tumanov Yu.V., Voevoda M.I., Belyavskaya V.A. Tick-borne encephalitis and vaccines: genetic and physiological factors influencing the functional activity of specific antibodies. *Proceedings of the Scientific and Practical Conference. Novosibirsk*, 2016;191-193. (in Russian)
- Medunitsin N.V. Vaccinology. Moscow: Triada-X Publ., 2004. (in Russian)
- Ogura Y., Inohara N., Benito A., Chen F.F., Yamaoka S., Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* 2001;276:4812-4818. DOI 10.1074/jbc.M008072200.
- Poland G.A., Kennedy R.B., Ovsyannikova I.G. Vaccinomics and personalized vaccinology: is science leading us toward a new path of directed vaccine development and discovery? *PLoS Pathog.* 2011;7:e1002344.
- Poland G.A., Ovsyannikova I.G., Jacobson R.M. Vaccine immunogenetics: bedside to bench to population. *Vaccine*. 2008;26:6183-6188.
- Pulendran B., Miller J., Querec T.D., Akondy R., Moseley N., Laur O., Glidewell J., Monson N., Zhu T., Zhu H., Staprans S., Lee D., Brinton M.A., Pereygin A.A., Vellozzi C., Brachman P. Jr., Lalor S., Teuwen D., Eidex R.B., Cetron M., Priddy F., del Rio C., Altman J., Ahmed R. Case of yellow fever vaccine – associated viscerotropic disease with prolonged viremia, robust adaptive immune responses, and polymorphisms in CCR5 and RANTES genes. *J. Infect. Dis.* 2008;198:500-507. DOI 10.1086/590187.
- Sambrook J., Russell D.W. The condensed protocols from Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006.
- Sanda C., Weitzel P., Tsukahara T., Schaley J., Edenberg H.J., Stephens M.A., McClintick J.N., Blatt L.M., Li L., Brodsky L., Taylor M.W. Differential gene induction by type I and type II interferons and their combination. *J. Interferon Cytokine Res.* 2006;26:462-472.
- Thamizhmani R., Vijayachari P. Association of dengue virus infection susceptibility with polymorphisms of 2'-5'-oligoadenylate synthetase genes: a case-control study. *Braz. J. Infect. Dis.* 2014;18:548-550.
- UCSC Genome Browser Gateway. 2017. Available at http://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?hgsid=225788287_h9n14RnxWsBd3VHZFAl6jALan0UJ.

- Valarcher J.F., Hägglund S., Juremalm M., Blomqvist G., Renström L., Zohari S., Leijon M., Chirico J. Tick-borne encephalitis. *Rev. Sci. Tech.* 2015;34:453-466.
- Vector-Best Company. Reagents for cytokine analysis. 2004. Available at <http://www.cytokines.ru/2004/4/Art12.php>. (in Russian)
- Yakub I., Lillibridge K.M., Moran A., Gonzalez O.Y., Belmont J., Gibbs R.A., Tweardy D.J. Single nucleotide polymorphisms in genes for 2'-5'-oligoadenylatesynthetase and RNase L in patients hospitalized with West Nile virus infection. *J. Infect. Dis.* 2005;192: 1741-1748.
- Yudin N.S., Barkhash A.V., Maksimov V.N., Ignatieva E.V., Romaschenko A.G. Human genetic predisposition to diseases caused by viruses from Flaviviridae family. *Molecular Biology (Moscow)*. 2018;52:165-181.
- Zamorano J., Rivas M.D., Pérez M. Interleukin-4: A multifunctional cytokine. *Inmunologia*. 2003;22:215-224.

Межлинейные различия по эмоциональным и весовым параметрам у крыс с кататоническим типом реагирования и крыс Вистар

Т.А. Алехина , Р.В. Кожемякина

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

При отборе животных по поведению наблюдаются прямой селективный эффект и изменения в неспецифических стрессорных функциях. В селекционируемой линии появляются новые поведенческие формы, отличающиеся от отбираемых форм по селекционному критерию. В линии ГК (генетическая кататония) в большом количестве стали рождаться «нервные» крысы. Селекционный критерий предполагает отбор по признаку длительного застывания, однако «нервные» особи характеризуются повышенным уровнем моторной возбудимости: побежками, прыжками и вокализацией. Основной целью настоящей работы было определение фенотипических параметров у крыс линии ГК и выделение главных компонент изменчивости по эмоциональным и весовым показателям. Контролем служили крысы из исходной популяции Вистар. Измеряли время каталептического застывания, уровень возбудимости животных, артериальное давление, акустический рефлекс вздрагивания, судорожную активность, массу сердца, почек, надпочечников, селезенки. Применяли методы многомерного анализа: факторный анализ и метод главных компонент. В исследуемом поколении крыс ГК подтверждена склонность к застыванию в спокойной обстановке и после действия сильного аудиогенного раздражителя, отмечены более интенсивные реакции вздрагивания, умеренная гипертензия, более высокий относительный вес сердца и надпочечников. Выделены две основные компоненты изменчивости: амплитуда вздрагивания (PC1) и морфофункциональная изменчивость (PC2). Определено различное расположение точек у особей Вистар и ГК в координатах первых главных компонент. Получено подтверждение генетического единства реакций застывания и «нервности» с помощью метода главных компонент. Показано, что в PC2 абсолютные показатели массы сердца, почек, надпочечников и селезенки вносят отрицательный вклад при положительных значениях таких показателей, как застывание и «нервность». В этой же компоненте отмечено усиление реакций застывания и «нервности» при положительной корреляции с относительной массой сердца и надпочечников. Обсуждаются различия по знакам вкладов во вторую компоненту морфофункциональной изменчивости.

Ключевые слова: модель кататонии; селекция; рефлекс вздрагивания; артериальное давление; эпилепсия; вес органов; многомерный анализ.

Interstrain differences in emotional and weight indices in GC rats with catatonic response and Wistar rats

T.A. Alekhina , R.V. Kozhemjakina

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

In selecting rats for behavior, we observe a direct natural effect and affect the nonspecific stress function. In this process, new behavioral phenotypes appear in the strain under selection. They differ from the selected forms in the selection criterion. In the GC strain, a large proportion of the so-called nervous rats emerge. The criterion presumes the selection for the long cataleptic freezing character, whereas the nervous rats display elevated motor excitement: running, jumping, and vocalization. The main purpose of our study was to assess phenotypic indices in GC rats (abbreviated from genetic and catatonia) and recognize principal components of variability for emotional and weight indices. Rats of the ancestral Wistar population were taken as control. The following indices were measured: time of cataleptic freezing, excitement level, blood pressure, acoustic startle response, seizure activity, and weights of the heart, kidneys, adrenals, and spleen. Multivariate analysis methods were applied: factor analysis and principal component analysis. We confirmed the inclination of GC rats of the generation studied to freezing in quiet surrounding and after a strong acoustic stimulus. More pronounced startle responses, moderate hypertension, and larger weights of the heart and adrenals were noted. Two principal variability components were recognized: startle amplitude (PC1) and morphofunctional variability (PC2). The figure shows different locations of Wistar and GC individuals in principal component coordinates. The principal component method confirmed the genetic relationship between the startle and nervousness responses. It was shown that in PC2 the indices of heart, kidney, adrenal, and spleen weight exert negative effects, whereas the effects of startle and nervousness were positive. In the same component, an increase in the startle and nervousness responses positively correlates with the relative weights of the heart and adrenals. Differences in the directions of the contributions to the second component of morphofunctional variability are discussed.

Key words: model of catatonia; selection; startle-reflex; arterial pressure; epilepsy; organ weights; multidimensional analysis.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Алехина Т.А., Кожемякина Р.В. Межлинейные различия по эмоциональным и весовым параметрам у крыс с кататоническим типом реагирования и крыс Вистар. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(4):452-458. DOI 10.18699/VJ18.382

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Alekhina T.A., Kozhemjakina R.V. Interstrain differences in emotional and weight indices in GC rats with catatonic response and Wistar rats. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(4):452-458. DOI 10.18699/VJ18.382 (in Russian)

При отборе животных по сложным признакам участвуют регуляторные системы организма, что отражается на изменении поведения особей селекционируемых линий (Беляев, 1962; Беляев, Бородин, 1982). Так, оказалось, что в ходе селекции на сохранение неподвижной позы (катаlepsии) у крыс линии ГК (от слов «генетическая» и «катаlepsия») стали появляться высоко возбудимые («нервные») животные, которых в англоязычной литературе называют jerky – с рывковыми движениями и jumping – прыгающие (Javelot et al., 2011; Himmler et al., 2013). Начиная с 40-го поколения селекции линии ГК доля таких животных к 70-му поколению селекции увеличилась до 62 % (рис. 1). Появление нового признака ассоциировано с гормональными изменениями. В первом поколении селекции крысы ГК не отличались от исходной популяции Вистар по уровню кортикостерона – одного из основных маркеров стрессорной реактивности. В 17-м поколении уровень этого гормона при стрессе был снижен (Шульга и др., 1996); в 45-м он снизился в состоянии покоя (Амтиславский и др., 2000); в 65-м поколении в спокойном состоянии он повысился более чем в два раза по сравнению с исходной популяцией Вистар (Алехина и др., 2016). При этом шло нарастание доли животных с «нервными» реакциями в линии ГК (Чугуй и др., 2007), в последнем, 76-м, поколении селекции у 90 % крыс линии ГК наблюдалась «нервность».

«Нервные» реакции в каталептической линии выражаются в повышенной пугливости, вокализации, пароксизмальных побегках (Чугуй и др., 2007), «раздражительной агрессивности» (Nikulina et al., 1987), более интенсивных реакциях вздрагивания (Попова и др., 1999), агрессии страха (Алехина и др., 2016). К сопутствующим признакам можно отнести умеренную гипертонию, расстройство сна (Оганесян и др., 1990), нарушение эстральной цикличности (Клочков и др., 2011), дисбаланс стероидных гормонов (Шульга и др., 1996).

Известно, что отбор крыс по эмоциональным параметрам – уровням тревожности (линии HAB-LAB), дефекации (линии MR-MNR), обучаемости условной реакции активного избегания (линии RHA-RLA), фоновому уровню артериального давления (линии SHR-WKY), артериального давления при эмоциональном стрессе (линии НИСАГ-WAG) – ассоциирован с разными гормональными профилями. В состоянии стресса происходит активация системы гипоталамус–гипофиз–надпочечники (ГГНС) путем усиления секреции кортикотропин-релизинг-гормона, через него – секреции АКТГ и стимуляции синтеза кортикостерона. Показана стимуляция двух последних звеньев ГГНС в линиях HAB vs LAB (по уровням АКТГ и кортикостерона) (Salome et al., 2006), в MR vs MNR (по уровню АКТГ) (Kosti et al., 2006), в SHR vs Wistar (по уровню кортикостерона) (Roman et al., 2004) и у ГК vs Вистар (по уровню кортикостерона) (Алехина и др., 2016). В линиях RHA/Verh vs RLA/Verh (Ferré et al., 1995) и НИСАГ vs Вистар (Maslova et al., 1998) обнаружено снижение содержания стресс-зависимого гормона при развитии стресса. Наряду с этим у интактных животных указанных линий после нескольких десятков поколений отбора были обнаружены различия в весе сердца, почек, надпочечников, селезенки и тимуса (Hlavacova et al.,

2006; Redina et al., 2006; Salome et al., 2006; Редина и др., 2014). Выявление различий между селекционируемой и исходной линиями по стресс-зависимым параметрам может быть использовано как один из подходов к изучению физиологических механизмов эмоциональной реактивности у особей этих двух моделей (Ramos, Mormede, 1998).

Основной задачей настоящего исследования было проанализировать различия между параметрами эмоциональной реактивности животных (по параметрам катаlepsического застывания, реакциям «нервности», вздрагивания, артериального давления, на сильный акустический сигнал) и массой внутренних органов при помощи многомерного анализа у крыс линии ГК 77-го поколения селекции и у крыс из исходной популяции Вистар.

Материалы и методы

Экспериментальные животные. Исследования выполнены на крысах-самцах линий Вистар ($n = 8$) и ГК ($n = 10$) 77-го поколения селекции. Крысы обеих линий родились в июле 2015 г. (с разбросом по датам рождения в 10 дней) и были включены в опыт в четырехмесячном возрасте. Животных содержали в виварии ФИЦ ИЦиГ СО РАН при свободном доступе к воде и корму. Все процедуры на крысах проведены в соответствии с рекомендациями Комиссии по биоэтике ИЦиГ СО РАН и Европейского парламента и Совета Европейского Союза (директива 2010/63/EU от 22 сентября 2010 года).

Тест на застывание (катаlepsию). Животных рассаживали по одному в клетку и через сутки начинали тестирование. Осторожно, без резких движений, помещали крысу в угол клетки, с помощью тестера приподнимали ее за морду в вертикальную стойку и измеряли время пассивного сохранения крысой этой насильственно приданной ей позы. Предрасположенными к катаlepsии считали тех животных, которые застывали дольше 10 с. Тестирование проводилось не менее трех раз в неделю. Когда крысы ГК стали проявлять «нервные» реакции, регистрировали время застывания у них при проведении тестером по прутьям клетки. У одной и той же крысы одновременно фиксировали и время застывания, и «нервные» реакции.

Тест на «нервность». Наряду с тестированием на застывание оценивали «нервную» реакцию. Если животное при касании тестера вздрагивает или совершает побегки и мечется по клетке, то присваивали 1 балл; если крыса спокойно реагирует на тестер, обнюхивает или грызет его, то ставили 0 баллов.

Тестирование аудиогенной эпилепсии. Использовали камеру из оргстекла с пластиковым полом размером 50 × 50 × 50 см и закрепленным с внутренней стороны электрическим звонком (сила звука – 110 дБ, частота – 60 Гц). Время тестирования с включенным звуком – в пределах 1 мин. Оценку реакции производили по балльной системе: 0 – отсутствие двигательного возбуждения; 1 – беспорядочные прыжки и бег; 2 – двухволновый припадок; 3–4 – клонико-тонические судороги. Измеряли время постиклонной катаlepsии в секундах. Использовали видеокамеру Panasonic HDC-SD40.

Реакции в Startle-боксе. Акустический рефлекс вздрагивания исследовали в аппарате Startle Response (TSE Equipment). Аппарат представляет собой звукопрони-

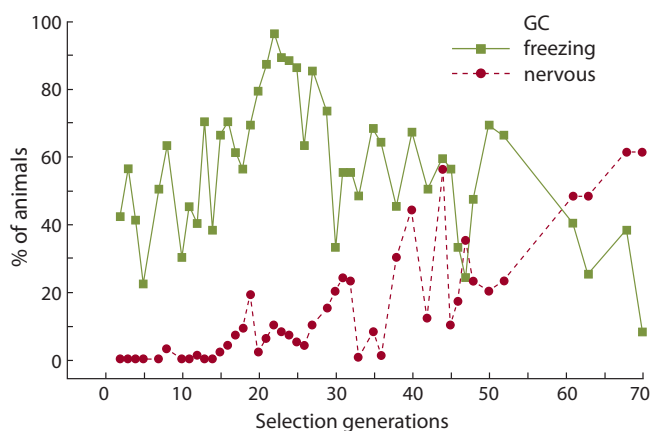


Fig. 1. Variation of the percentages of freezing and nervous animals during the selection of GC rats.

цаемый бокс с чувствительной платформой, на которую помещается рестрикционная клетка. Период адаптации длился 3 мин (белый шум, 65 дБ). Затем давали 10 звуковых сигналов (белый шум 40 мс, 115 дБ). Длительность интервалов между сигналами – 15 с. Колебание платфор-

мы регистрировалось автоматически, цифровые величины силы давления на платформу переносились на компьютер. Амплитуду вздрагивания определяли как максимальное давление на платформу, деленное на массу тела животного. Показатель «привыкания старт-реакции» вычисляли как разницу между (амплитудой вздрагивания-1 минус амплитуду вздрагивания-10), деленную на амплитуду вздрагивания-1.

Измерение артериального давления (АД) выполняли сфигмографическим методом, при котором регистрируются колебания сосудистой стенки артерии хвоста (Pfeffer et al., 1971) под эфирным наркозом. Спустя неделю после измерения АД в покое определяли АД в узких трубках без наркоза (стресс при ограничении подвижности) через 15 и 30 мин.

Вес органов. Декапитацию проводили при помощи гильотины в состоянии эфирного наркоза, измеряли массу сердца, почек и надпочечников на электронных весах (серии SK/SK-D/SK-WP).

Статистическую обработку проводили с использованием пакета программ Statistica 10.0. Различия по поведенческим и физиологическим параметрам (реакции застывания, «нервности», амплитуда вздрагивания, артери-

Table 1. Phenotypic indices in Wistar and GC rats

Character	Wistar (n = 8)	GC (n = 10)	Confidence (LSD test)
Freezing, s	1.13±0.74	8.2±2.9	$p < 0.05$
Nervousness score	0.0±0.0	1.0±0.0	$p > 0.05$
Startle-1/body weight	1.83±0.34	1.91±0.41*	»
Startle-2/body weight	1.56±0.26	1.96±0.36*	»
Startle-3/body weight	1.39±0.23	2.01±0.42*	»
Startle-4/body weight	1.12±0.21	1.62±0.38*	»
Startle-5/body weight	1.16±0.22	1.73±0.39*	»
Startle-6/body weight	1.14±0.26	1.74±0.41*	»
Startle-7/body weight	1.36±0.36	1.71±0.38*	»
Startle-8/body weight	1.43±0.30	1.72±0.32*	»
Startle-9/body weight	1.38±0.33	1.92±0.46*	»
Startle-10/body weight	1.53±0.36	1.83±0.49*	»
BP under anesthesia, mmHg	128.6±4.8	139.2±3.4	$p = 0.08$
BP after 15 min, mmHg	146.9±3.6	160.9±5.3	$p = 0.05$
BP after 30 min, mmHg	155.0±5.1	176±5.7	$p < 0.02$
Audiogenic seizure score	0.38±0.38	0.50±0.27	$p > 0.05$
Postictal catalepsy, s	113.4±35.8	251.5±32.6	$p = 0.01$
Body weight, g	460.9±12.1	300.9±8.4	$p = 0.000$
Heart weight, g	1.54±0.06	1.15±0.04	»
Kidney weight, g	3.45±0.09	2.23±0.04	»
Adrenal weight, mg	68.1±3.1	58.3±2.31	$p < 0.05$
Spleen weight, g	1.31±0.04	0.93±0.04	$p = 0.000$
Heart/body weight ($\times 10^{-3}$)	3.3±0.1	3.8±0.1	$p > 0.05$
Kidneys/body weight ($\times 10^{-3}$)	7.5±0.1	7.4±0.1	»
Adrenals/body weight ($\times 10^{-3}$)	0.148±0.01	0.195±0.01	$p = 0.001$
Spleen/body weight ($\times 10^{-3}$)	2.85±0.10	3.09±0.09	$p > 0.05$

* $F(1, 160) = 6.6; p = 0.01; n$, number of animals.

альное давление, припадки, длительность каталепсии, масса внутренних органов) оценивали при помощи однофакторного дисперсионного анализа в программе ANOVA по LSD-критерию. Достоверность изменений направления реакций по акустическому рефлексу вздрагивания определяли по двухфакторному дисперсионному анализу. Идентификацию основных факторов изменчивости фенотипических параметров проводили при помощи метода главных компонент (PCA).

Результаты

Тест на застывание. Время сохранения неподвижной позы у крыс ГК было в три раза выше, чем у крыс Вистар ($p < 0.05$) (табл. 1). Однако время застывания крыс ГК не достигало выбранного ранее критерия – 10 с. Иными словами, в линии ГК доминирующей реакцией в тесте стало «нервное» реагирование, а доля «застывающих» крыс снизилась до 10 % (см. рис. 1).

Тест на «нервность». Крысы Вистар реагировали на тестер спокойно, и каждой из них было присвоено 0 баллов. Крысы ГК, напротив, проявляли пугливость, каждой из них было присвоено по 1 баллу (см. табл. 1).

Тестирование аудиогенной эпилепсии. Не было обнаружено различий по числу припадков и их интенсивности, вызванных звуковым раздражителем у крыс Вистар и ГК (см. табл. 1). Длительность постиктальной каталепсии после выключения звука у крыс ГК была почти в два раза выше, чем у крыс Вистар (см. табл. 1). Каталептическое застывание проявлялось у особей ГК при отсутствии приступов. У животных популяции Вистар не наблюдалось каталептического застывания, если у них не было припадков.

Реакции в startle-боксе. По абсолютным размерам амплитуды стартл-реакции (10 звуковых сигналов) межлинейных различий по LSD-критерию не найдено. Однако по относительным значениям этого показателя у крыс ГК она была повышена в каждой точке в среднем на 32 % ($F(1, 160) = 6.6; p = 0.01$). Различия подтверждают повышенную реакцию «нервности» у крыс с наследственной кататонией.

Измерение артериального давления. Выявлена тенденция к повышенному уровню АД у крыс ГК по сравнению с Вистар под эфирным наркозом ($p = 0.08$) и через 15 мин после помещения животного в узкую трубку ($p = 0.05$). Значимый подъем уровня АД у животных линии ГК ($p < 0.05$) по сравнению с контролем был обнаружен через 30 мин после начала эксперимента (см. табл. 1).

Вес органов. В возрасте четырех месяцев масса крыс ГК была ниже на 35 % по сравнению с крысами Вистар, как и масса внутренних органов (сердца, почек и надпочечников). Значимые отличия ГК от Вистар выявлены и по относительной массе органов у крыс ГК. По сравнению с Вистар у крыс ГК было отмечено существенное увеличение массы сердца и надпочечников (см. табл. 1).

Метод главных компонент (PCA). Из 41 исследуемого признака у крыс ГК и Вистар выявлены две основные компоненты изменчивости. Они взяли на себя более половины общей дисперсии по изучаемым признакам: PC1 – 44.7 % и PC2 – 19.3 %. Большую положительную нагрузку в первую компоненту внесли вклады по реакци-

ям вздрагивания. Этот фактор был назван «амплитудой вздрагивания» (табл. 2).

Основной вклад во вторую компоненту, PC2, сформирован за счет вкладов таких показателей, как длительность

Table 2. Contributions of phenotypic indices to the first two components

Index	PC1 (44.7 %)	PC2 (19.3 %)
1. Freezing, s	–0.22	0.58
2. Nervousness score	–0.10	0.93
3. Startle-1	–0.31	–0.46
4. Startle-2	–0.52	–0.06
5. Startle-3	–0.84	–0.20
6. Startle-4	–0.92	–0.20
7. Startle-5	–0.82	–0.06
8. Startle-6	–0.93	–0.14
9. Startle-7	–0.87	–0.21
10. Startle-8	–0.85	–0.32
11. Startle-9	–0.87	–0.16
12. Startle-10	–0.82	–0.27
13. Startle 1–5	–0.88	–0.28
14. Startle 6–10	–0.93	–0.24
15. Startle-1/body weight	–0.50	–0.08
16. Startle-2/body weight	–0.57	0.32
17. Startle-3/body weight	–0.85	0.15
18. Startle-4/body weight	–0.91	0.10
19. Startle-5/body weight	–0.84	0.23
20. Startle-6/body weight	–0.92	0.13
21. Startle-7/body weight	–0.93	0.06
22. Startle-8/body weight	–0.95	0.04
23. Startle-9/body weight	–0.87	0.13
24. Startle-10/body weight	–0.84	0.02
25. Startle 1–5/body weight	–0.90	0.17
26. Startle 6–10/body weight	–0.96	0.08
27. Habituation	0.05	–0.10
28. BP under anesthesia, mmHg	–0.04	0.55
29. BP after 15 min, mmHg	–0.19	0.57
30. BP after 30 min, mmHg	–0.37	0.62
31. Audiogenic seizures	0.18	–0.06
32. Postictal catalepsy	–0.40	0.45
33. Body weight	0.06	–0.98
34. Heart weight	0.04	–0.81
35. Kidney weight	0.03	–0.95
36. Adrenal weight	0.03	–0.59
37. Spleen weight	–0.12	–0.85
38. Heart/body weight	–0.05	0.65
39. Kidneys/body weight	–0.16	0.11
40. Adrenals/body weight	–0.02	0.73
41. Spleen/body weight	–0.43	0.44

Note: Contributions of indices ($p < 0.50$) are shown in boldface.

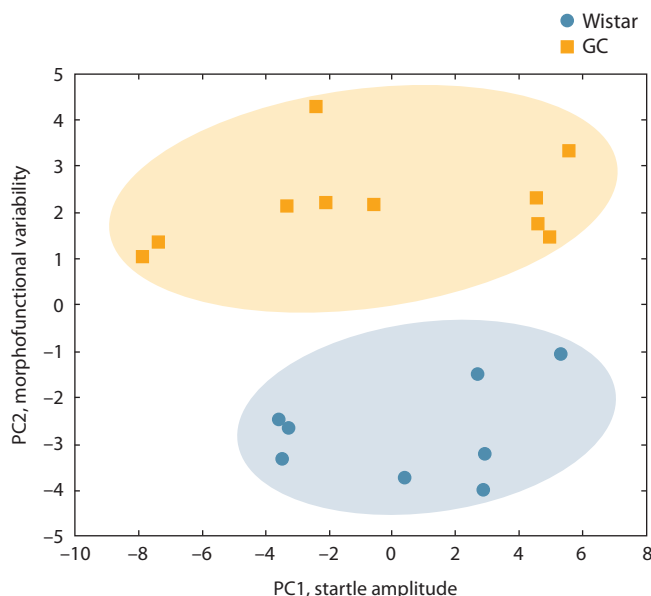


Fig. 2. The distribution of Wistar and GC in coordinates of principal components PC1 (startle amplitude) and PC2 (morphofunctional variability).

застывания, выраженность «нервности», АД под наркозом и при стрессе, масса тела, сердца, почек, надпочечников и селезенки. Вторую главную компоненту назвали «морфофункциональной изменчивостью» (см. табл. 2).

На рис. 2 показано, что пространства – «облака», сформированные из вкладов признаков в линиях ГК и Вистар, находятся в разных частях по оси морфофункциональной изменчивости. Это означает, что такие параметры, как застывание, «нервность», АД и масса исследуемых органов, взаимозависимы и различаются по расположению.

Обсуждение

Подтверждена «кататоническая» структура по ряду фенотипических признаков у крыс линии ГК в 77-м поколении селекции. Взятые в исследование параметры указывают на склонность крыс к каталептическому застыванию в домашней клетке, большую длительность постиктальной каталепсии, повышенную амплитуду реакций вздрагивания, сниженный вес тела и более высокий вес сердца и надпочечников. Значительная часть основных фактов была получена на ранних поколениях селекции (Попова и др., 1999; Алехина и др., 2016), что подтверждает наследуемость этих признаков.

У крыс линии ГК в 77-м поколении селекции еще раз было подтверждено наличие «нервных» реакций, что можно рассматривать у них как повышенный уровень тревожности. В линии НАВ (high anxiety-related behavior), селектированной по признаку проявления тревожных реакций, выявлены разнонаправленные отклонения в гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой (ГГНС) и в симпатoadреналовой (САС) системах: установлены гиперреактивность в ГГНС и гипореактивность в САС. При этом был определен более высокий вес надпочечников у крыс линии НАВ по сравнению с крысами LAB (low anxiety-related behavior) (Salome et al., 2006). Такие же фенотипи-

ческие корреляты показаны и в линии ГК, селектируемой по длительности пассивно-оборонительной реакции застывания (Алехина и др., 2016). Схожесть результатов, обусловленных селекцией на тревожность и вызванные стрессом кататонические реакции, говорит об общих звеньях в физиологических механизмах, свойственных линиям ГК и НАВ, несмотря на разные критерии отбора. По-видимому, связующим звеном является повышенная общая возбудимость нервной системы, которая выражается в тревожных реакциях в линии НАВ и «нервных» реакциях в линии ГК.

Метод главных компонент позволяет объединить все исследуемые параметры, включая эмоциональные и весовые. Из суммы показателей были выделены две независимые компоненты, охватывающие более 60 % общей изменчивости. По содержанию они были обозначены нами как амплитуда вздрагивания (PC1) и морфофункциональная изменчивость (PC2). Названные компоненты являются автономными. Так, к разным компонентам относятся параметры «вздрагивания» и реакции «нервности». Этот факт объясняет снижение реакций вздрагивания и повышение уровней возбудимости на определенном этапе селекции у крыс в линии со стереотипиями (Колпаков и др., 2000). Физиологические механизмы реакций вздрагивания и стрессорных реакций также отличаются. При вздрагивании как рефлексе реагируют кохлеарные (слуховые) ядра мозга, которые находятся в его стволовой части, а при повышенной возбудимости при стрессе происходит активация верхних отделов центральной нервной системы, включая лимбические структуры и лобную кору.

Еще одно подтверждение генетического единства реакций застывания и «нервности» мы получили при помощи метода главных компонент. Оба эти параметра внесли достоверный положительный вклад в компоненту PC2. Это означает, что несмотря на их поведенческую противоположность – отсутствие двигательных реакций при застывании и повышение моторной возбудимости при проявлении «нервности», – они оказались взаимозависимы и однонаправленны. Этот факт свидетельствует о едином ядре каталептического застывания и «нервности» у крыс линии ГК (Чугуй и др., 2007). Нужно обратить внимание на то, что абсолютные и относительные весовые показатели в компоненте PC2 имеют разные знаки. Абсолютные показатели массы сердца, почек, надпочечников и селезенки вносят отрицательный вклад в PC2. Следовательно, снижение массы этих органов ассоциировано с усилением реакций застывания и «нервности». В то же время усиление этих реакций положительно коррелирует с относительной массой сердца и надпочечников (так как все эти параметры вносят в PC2 положительный вклад). В наших работах показано, что селекция на кататонию привела к снижению веса животных в линии ГК (Клочков и др., 2011; Алехина и др., 2016). Вместе с тем повышение относительного веса сердца и надпочечников представляется закономерным процессом при таких состояниях, как гипертония и «нервность». Измененная пропорция весовых показателей надпочечников стала результатом длительной селекции у крыс ГК (Алехина и др., 2016). Сходные результаты, приведшие к отклонениям в весе надпочечников, отмечены и на других селекционных мо-

делях, отбираемых по эмоциональным признакам (Plyusnina, Oskina, 1997; Redina et al., 2006; Salome et al., 2006; Solberg et al., 2006). Из анализа структуры PC2, т.е. знака и величины вкладов исследованных признаков в нее, следует, что при общем снижении веса тела и органов у крыс, селекционируемых на кататонию, уменьшение веса тела у них выражено значительно сильнее, чем снижение массы сердца и надпочечников.

Показано, что «облако» параметров, сформированное из вкладов признаков линии ГК, расположено выше «облака» Вистар по оси PC2 и не пересекается с ним (см. рис. 2). Судя по значениям параметров в PC2, эти признаки отражают уровень стрессорной реактивности и весовые показатели внутренних органов, участвующих в стрессовых реакциях. Это свидетельствует об ассоциации описанных выше признаков в организме и отличии их вкладов у крыс линий ГК и Вистар.

Таким образом, у крыс линии ГК, прошедших длительный процесс селекции, была подтверждена «кататоническая» структура поведения: показаны наследственные реакции каталепсии в покое и при стрессе и реакции «нервности». Эта структура поведения ассоциирована с умеренной гипертензией и увеличенной массой сердца и надпочечников по сравнению с крысами из исходной популяции Вистар.

Acknowledgments

This study was supported by State Budgeted Project 0324-2018-0016 and the Russian Foundation for Basic Research, project 17-04-01631. Use of the equipment of the Shared Access Center was supported by the Russian Ministry of Education and Science, project RFMEFI62117X0015. The authors are grateful to researchers of the Institute of Cytology and Genetics (Novosibirsk) Dr. Sci. (Biol.) V.M. Efimov, Cand. Sci. (Biol.) A.V. Kharlamova, and Cand. Sci. (Biol.) Yu.E. Herbeck for valuable discussion.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Alekhina T.A., Palchikova N.A., Kozhemjakina R.V., Prokudina O.I. Destabilization signs in behavioral and somatovegetative parameters of rats selected for catatonia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekt-sii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(1):28-33. DOI 10.18699/VJ16.103. (in Russian)
- Amstislavsky S.Ya., Bulygina V., Maslova L.N., Alekhina T.A., Barykina N.N., Chuguy V.F., Popova N.K., Kolpakov V.G. Effect of cross-fostering on some physiological and behavioral features in Wistar and GC (genetically cataleptic) rat strains. *Rossiyskiy Fiziologicheskii Zhurnal im. I.M. Sechenova* = I.M. Sechenov Physiological Journal. 2000;86(12):1630-1637. (in Russian)
- Belyaev D.K. On some problems of correlative variability and their implications for the theory of evolution and breeding animals. *Izvestiya SO AN SSSR* = Bulletin of the Siberian Branch of the USSR Academy of Sciences. 1962;10:111-124. (in Russian)
- Belyaev D.K., Borodin P.M. The impact of stress on the genetic variability and its role in evolution. In: *Evolutionary Genetics*. Leningrad: Leningrad State University Publ., 1982;35-59. (in Russian)
- Chuguy V.F., Kolpakov V.G., Barykina N.N. Catalepsy and "nervousness" in rats: results of replicated selection. *Genetika* = Genetics (Moscow). 2007;43(2):276-279. (in Russian)
- Ferré P., Fernández-Teruel A., Escorihuela R.M., Driscoll P., Corda M.G., Giorgi O., Tobeña A. Behavior of the Romans/Verh high- and low-avoidance rat lines in anxiety tests, relationship with defecation and self-grooming. *Physiol. Behav.* 1995;58:1209-1213.
- Himmler B.T., Stryjek R.S., Modlinska K., Derksen S.M., Pisula W., Pellis S.M. How domestication modulates play behavior: a comparative analysis between wild rats and a laboratory strain of *Rattus norvegicus*. *J. Comp. Psychol.* 2013;127(4):453-464. DOI 10.1037/a0032187.
- Hlavacova N., Bakos J., Jezova D. Differences in home cage behavior and endocrine parameters in rats of four strains. *Endocr. Regul.* 2006;40(4):113-118.
- Javelot H., Weiner L., Terramorsi R., Rougeot C., Lalonde R., Mes-saoudi M. Efficacy of chronic antidepressant treatments in a new model of extreme anxiety in rats. *Depress. Res. Treat.* 2011;1-10. DOI 10.1155/2011/531435.
- Klochkov D.V., Alekhina T.A., Prokudina O.I. Age-specific features of estrous cycles and folliculogenesis in GC female rats selected by catatonic reactivity. *Byulleten Eksperimentalnoy Biologii i Meditsiny* = Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2011; 151(2):219-222. (in Russian)
- Kolpakov V.G., Alekhina T.A., Barykina N.N., Chuguy V.F., Popova N.K. Physiological manifestations of the action of a gene regulating predisposition to a pendulum-like movements in rodents. *Rossiyskiy Fiziologicheskii Zhurnal im. I.M. Sechenova* = I.M. Sechenov Physiological Journal. 2000;86(1):33-40. (in Russian)
- Kosti O., Raven P.W., Renshaw D., Hinson J.P. Intra-adrenal mechanisms in the response to chronic stress: investigation in rat model of emotionality. *J. Endocrinol.* 2006;189:211-218. DOI 10.1677/joe.1.06638.
- Maslova L.N., Shishkina G.T., Bulygina V.V., Markel A.L., Naumenko E.V. Brain catecholamines and the hypothalamo-hypophyseal-adrenocortical system in inherited arterial hypertension. *Neurosci. Behav. Physiol.* 1998;28(1):38-44.
- Nikulina E.M., Popova N.K., Kolpakov V.G., Alekhina T.A. Brain dopaminergic system in rats with a genetic predisposition to catalepsy. *Biogenic Amines*. 1987;4(4-6):399-406.
- Oganesian G.A., Khomutetskaya O.E., Bogoslovskii M.M., Karmanova I.G., Kolpakov V.G., Barykina N.N. The wakefulness-sleep cycle in rats with a genetic predisposition to catalepsy. *Zhurnal Evolyutsionnoy Biokhimii i Fiziologii* = Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. 1990;26(3):376-382. (in Russian)
- Pfeffer J.M., Pfeffer M.A., Flochlich E.D. Validity of an indirect tailcuff method for determining systolic arterial pressure in un-anesthetized normotensive rats. *J. Lab. Clin. Med.* 1971;78:962-975.
- Plyusnina I.Z., Oskina I.N. Behavioral and adrenocortical responses to open-field test in rats selected for reduced aggressiveness towards humans. *Physiol. Behav.* 1997;61(3):381-385.
- Popova N.K., Barykina N.N., Plyusnina I.Z., Alekhina T.A., Kolpakov V.G. Manifestation of fear response in rats genetically predisposed to various kinds of defense behavior. *Rossiyskiy Fiziologicheskii Zhurnal im. I.M. Sechenova* = I.M. Sechenov Physiological Journal. 1999;85(1):99-104. (in Russian)
- Ramos A., Mormede P. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neurosci. Behav. Rev.* 1998;22(1):33-57.
- Redina O.E., Mashanova N.A., Efimov V.M., Markel A.L. Rats with inherited stress-induced arterial hypertension (ISIAH strain) display specific QTL for blood pressure and for body and kidney weight on chromosome 1. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2006;33:456-464.
- Redina O.E., Smolenskaya S.E., Abramova T.O., Markel A.L. Genetic loci for spleen weight and blood pressure in ISIAH rats with inherited stress-induced arterial hypertension. *Molekulyarnaya Biologiya* = Molecular Biology (Moscow). 2014;48(3):407-415. (in Russian)
- Roman O., Seres J., Pometlova M., Jurcovicova J. Neuroendocrine or behavioral effects of acute or chronic emotional stress in Wistar Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive (SHR) rats. *Endocr. Regul.* 2004;38(4):151-155.

Salome N., Vitart O., Lesage J., Landgraf R., Vieau D., Laborie C. Altered hypothalamo-pituitary-adrenal and sympatho-adrenomedullary activities in rats bred for anxiety: central and peripheral correlates. *Psychoneuroendocrinology*. 2006;31:724-735. DOI 10.1016/j.psyneuen.2006.02.002.

Shulga V.A., Barykina N.N., Alekhina T.A., Kolpakov V.G. Some physiological characteristics of genetic predisposition of rats to

catalepsy. *Rossiyskiy Fiziologicheskiy Zhurnal im. I.M. Sechenova* = I.M. Sechenov Physiological Journal. 1996; 82(10-11):77-83. (in Russian)

Solberg L.C., Baum A.E., Ahmadiyeh N., Shimomura K., Li R., Turek F.W., Takahashi J.S., Churchill G.A., Redei E.E. Genetic analysis of the stress-responsive adrenocortical axis. *Physiol. Genomics*. 2006;27:362-369. DOI 10.1152/physiolgenomics.00052.2006.



Анализ доменной специфичности протективного химерного антитела ch14D5a против гликопротеина E вируса клещевого энцефалита

И.К. Байков¹✉, Л.А. Емельянова^{1,2}, Л.М. Соколова¹, Е.М. Карелина^{1,2}, А.А. Матвеев^{1,2}, И.В. Бабкин^{1,2}, Я.А. Хлусевич^{1,2}, В.Ф. Подгорный¹, Н.В. Тикунова^{1,2}✉

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

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

В настоящее время на основе протективного химерного антитела ch14D5a разрабатывается препарат для профилактики и терапии вируса клещевого энцефалита. Вместе с тем эпитоп, узнаваемый этим антителом на поверхности гликопротеина E, не локализован. Для терапевтического использования антитела ch14D5a крайне желательно знать механизм действия этого антитела, в том числе узнаваемый им эпитоп. Целью данной работы было выявить домен гликопротеина E, с которым связывается протективное антитело ch14D5a. Для этого с использованием бактериальной системы экспрессии было получено четыре рекомбинантных варианта гликопротеина E: 1) белок rE, содержащий домены D1, D2 и D3 гликопротеина E; 2) белок rED1+2, содержащий домены D1 и D2; 3) белок rED3_301, представляющий собой домен D3; 4) белок rED3_294, включающий домен D3 и шарнирный участок, соединяющий домены D1 и D3. Белки rED3_294 и rED3_301 были получены в растворимой мономерной форме, что подтверждено гель-фильтрационной хроматографией. Белки rE и rED1+2 экстрагированы из телец включения. Методами вестерн-блот анализа и поверхностного плазмонного резонанса установлено, что протективное химерное антитело ch14D5a и его Fab-фрагмент связываются с доменом D3 и не связываются с доменами D1 и D2 гликопротеина E вируса клещевого энцефалита. Поскольку антитела, узнающие эпитопы на поверхности домена D3, не склонны вызывать антителозависимое усиление инфекции по сравнению с антителами, направленными на домены D1 и D2, полученные данные подтверждают перспективность использования антитела ch14D5a при создании терапевтического препарата против вируса клещевого энцефалита.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита; гликопротеин E; домен D3; антитело; рекомбинантный белок; поверхностный плазмонный резонанс; картирование эпитопа.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Байков И.К., Емельянова Л.А., Соколова Л.М., Карелина Е.М., Матвеев А.Л., Бабкин И.В., Хлусевич Я.А., Подгорный В.Ф., Тикунова Н.В. Анализ доменной специфичности протективного химерного антитела ch14D5a против гликопротеина E вируса клещевого энцефалита. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(4):459-467. DOI 10.18699/VJ18.383

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Baykov I.K., Emelyanova L.A., Sokolova L.M., Karelina E.M., Matveev A.L., Babkin I.V., Khlusevich Ya.A., Podgornyy V.F., Tikunova N.V. Analysis of domain specificity of the protective chimeric antibody ch14D5a against glycoprotein E of tick-borne encephalitis virus. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(4):459-467. DOI 10.18699/VJ18.383 (in Russian)

Analysis of domain specificity of the protective chimeric antibody ch14D5a against glycoprotein E of tick-borne encephalitis virus

I.K. Baykov¹✉, L.A. Emelyanova^{1,2}, L.M. Sokolova¹, E.M. Karelina^{1,2}, A.L. Matveev^{1,2}, I.V. Babkin^{1,2}, Ya.A. Khlusevich^{1,2}, V.F. Podgornyy¹, N.V. Tikunova^{1,2}✉

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

A drug for the prevention and therapy of tick-borne encephalitis virus is being developed on the basis of the protective chimeric antibody ch14D5a. At the same time, the epitope recognized by this antibody on the surface of glycoprotein E has not been localized yet. The aim of this work was to identify the domain of glycoprotein E, to which the protective antibody ch14D5a binds. As a result, four recombinant variants of glycoprotein E were generated using the bacterial expression system: (1) the rE protein containing the domains D1, D2, and D3 of glycoprotein E; (2) the rED1+2 protein containing domains D1 and D2; (3) the rED3_301 protein, which is domain D3 of glycoprotein E, and (4) the rED3_294 protein comprising domain D3 and a hinge region connecting domains D1 and D3. The rED3_294 and rED3_301 proteins were obtained in soluble monomeric form. The rE and rED1+2 proteins were extracted from the inclusion bodies of *Escherichia coli*. Using Western blot analysis and surface plasmon resonance analysis, it was demonstrated that the protective chimeric antibody ch14D5a and its Fab fragment bound specifically to domain D3 of glycoprotein E. Since the antibodies recognizing epitopes on the surface of domain D3 do not tend to cause antibody-dependent enhancement of the infection as compared to antibodies directed to domains D1 and D2, the data obtained confirm the promise of using the antibody ch14D5a in the development of a therapeutic preparation against the tick-borne encephalitis virus.

Key words: tick-borne encephalitis virus; glycoprotein E; domain D3; antibody; recombinant protein; surface plasmon resonance; epitope mapping.

Received 31.08.2017

Accepted for publication 10.05.2018

© AUTHORS, 2018

Флавивирусы – семейство РНК-содержащих вирусов, включающих множество возбудителей опасных заболеваний человека. Актуальность получения рекомбинантных аналогов поверхностных белков различных флавивирусов определяется необходимостью разработки вакцин нового поколения (Chen, 2015; Rey et al., 2018), создания высокочувствительных тест-систем (Holbrook et al., 2004; Zidane et al., 2013), а также проведения структурных исследований (Rey et al., 1995; Wu et al., 2003; Volk et al., 2009). Рекомбинантные флавивирусные белки используются при изучении эпитопов, узнаваемых потенциально терапевтическими высоконейтрализующими и протективными антителами (Nybakken et al., 2005; Robinson et al., 2015; Barba-Spaeth et al., 2016; Zhao et al., 2016; Wang et al., 2017).

Антигенная структура флавивирусного гликопротеина Е непосредственным образом связана с пространственной структурой этого белка и его ориентацией на поверхности вириона. Гликопротеин Е расположен на поверхности зрелого вириона флавивирусов в количестве 180 молекул, организованных в виде 90 гомодимеров. Он состоит из доменов D1, D2 и D3 (рис. 1, а), а также двух трансмембранных доменов. D1 – центральный домен, объединяющий домены D2 и D3. Домен D2 отвечает за димеризацию гликопротеина Е, а также содержит гидрофобную петлю слияния, которая участвует в выходе вирусного капсида из эндосомы в цитоплазму клетки. Домен D3 взаимодействует с различными клеточными рецепторами и участвует в проникновении вируса в заражаемую клетку (Pierson, Kielian, 2013).

Доменная структура гликопротеина Е стабилизирована шестью дисульфидными связями, консервативными для всех флавивирусов. Известно, что эпитопы, узнаваемые вируснейтрализующими и протективными антителами, расположены во всех трех доменах гликопротеина (Dowd, Pierson, 2011). Эпитопы мышиных моноклональных антител, обладающих наиболее выраженными вируснейтрализующими и протективными свойствами, находятся преимущественно в области домена D3 (Roehrig, 2003; Oliphant et al., 2005; Sánchez et al., 2005; Dai et al., 2016), поэтому антитела, направленные к этому домену, представляют наибольший интерес с точки зрения профилактики и терапии флавивирусных инфекций. Известно также, что высоконейтрализующие и протективные антитела, направленные к петле слияния, вызывают антителозависимое усиление инфекции (Haslwanter et al., 2017). В связи с этим при разработке терапевтических препаратов против флавивирусов для потенциально терапевтического антитела должно быть подтверждено отсутствие связывания с петлей слияния гликопротеина Е.

Ранее на основе вируснейтрализующих моноклональных мышиных антител (Tsekhanovskaya et al., 1993) нами было сконструировано высокоаффинное химерное антитело ch14D5a, обладавшее способностью эффективно защищать модельных животных от сотен летальных доз вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) (Baykov et al., 2014; Тикунова и др., 2015). Доклинические испытания этого антитела показали его высокую эффективность, а также отсутствие токсических свойств (Тикунова и др., 2015). Однако для терапевтического использования препарата на

основе антитела ch14D5a необходимо детальное исследование механизма действия этого антитела, в том числе локализация эпитопа, с которым связывается антитело на поверхности гликопротеина Е.

Цель данной работы – выявить домен гликопротеина Е вируса клещевого энцефалита, с которым связывается протективное химерное антитело ch14D5a. Для этого были получены рекомбинантные белки, представляющие собой фрагменты гликопротеина Е, и исследовано взаимодействие антитела ch14D5a с этими белками методами поверхностного плазмонного резонанса и вестерн-блот анализа.

Материалы и методы

Материалы. Химерное антитело ch14D5a было наработано и очищено согласно методике, опубликованной ранее (Baykov et al., 2014). Fab-фрагмент антитела получен с использованием набора Pierce™ Fab Micro Preparation Kit (Thermo Scientific) согласно инструкции производителя. Комплементарная ДНК гена *E* вируса клещевого энцефалита, штамм Софьин, была предоставлена С.Е. Ткачёвым, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск).

Создание генетических конструкций для получения фрагментов гликопротеина Е. Фрагменты ДНК, кодирующие рекомбинантные белки rED3_294, rED3_301, rED1+2 и rE, были получены методом ПЦР по матрице кДНК гена *E* вируса клещевого энцефалита, штамм Sofjin-Ru (GenBank: AEP20480.1), с использованием праймеров: rED3_301_NcoI_dir: 5'-GCGCCATGGCCG GCGGTGGCTCGGGTCTTACATACACAATGTGCG-3'; rED3_294_NcoI_dir: 5'-GCGCCATGGCCGCGGGTG GCTCGCTAGAAAACTTAAGATGAAAGGTC-3'; rED3_his_NotI_rev: 5'-TTAGCGGCCGCTTAGTGATG GTGATGATGATGACTCCCTTTTGGAAACCATTTG-3'; rED1_SfiI_dir: 5'-ATAGGCCAGCCGCCATGGCCTC ACGGTGCACACATCTGG-3'; rED2_his_NotI_rev: 5'-TTA GCGGCCGCTTAGTGATGGTGATGATGATGTTTCAT CTTAAGTTTTCTAGCCC-3'. Фрагмент, кодирующий белок rED3_294, получен с использованием праймеров rED3_294_NcoI_dir и rED3_his_NotI_rev. Фрагмент, кодирующий белок rED3_301, – с использованием праймеров rED3_301_NcoI_dir и rED3_his_NotI_rev. С помощью праймеров rED1_SfiI_dir и rED2_his_NotI_rev получали фрагмент, кодирующий белок rED1+2, а с помощью праймеров rED1_SfiI_dir и rED3_his_NotI_rev – фрагмент, кодирующий белок rE.

Гены рекомбинантных белков кодировали глицин-сериновую последовательность на N-конце для повышения растворимости, а также C-концевую гексагистидиновую последовательность для очистки белков на Ni-NTA сорбенте. ДНК-фрагменты, кодирующие белки rED3_294 и rED3_301, были встроены в плазмидную ДНК pHEN2 по сайтам узнавания эндонуклеаз рестрикции *NcoI* и *NotI*. Фрагменты, кодирующие белки rED1+2 и rE, были встроены в ту же плазмиду по сайтам *SfiI* и *NotI*. Правильность конструкций pHEN2-rED3_294, pHEN2-rED3_301, pHEN2-rED1+2 и pHEN2-rE подтверждали секвенированием. Описанные конструкции депонированы в базу GenBank и имеют следующие номера: MH319019, MH383220, MH383221 и MH383222.

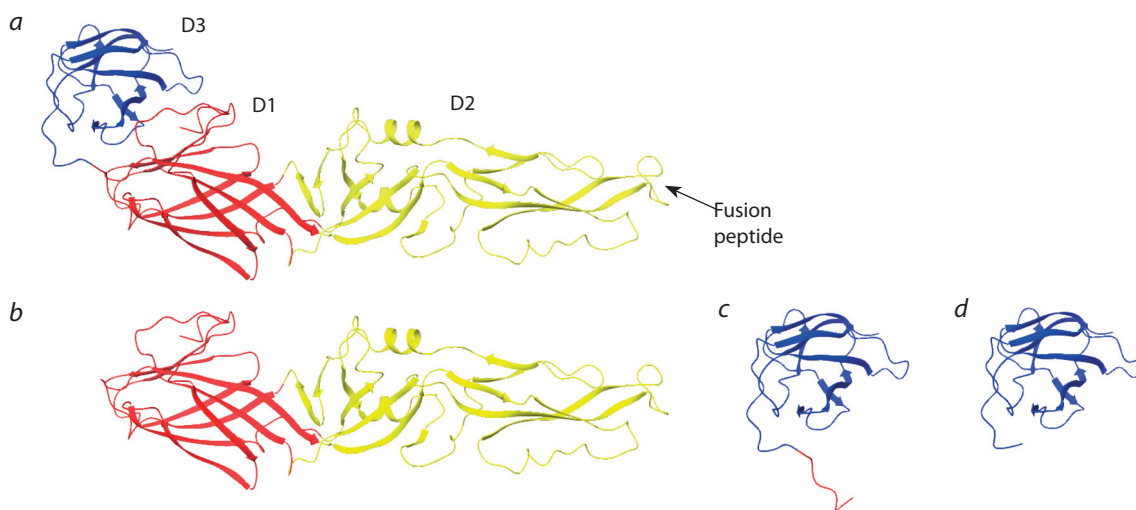


Fig. 1. Fragments of the 3D structure of glycoprotein E ectodomain: (a) protein rE, containing domains D1, D2, and D3; (b) protein rED1+2, containing domains D1 and D2; (c) protein rED3_294; (d) protein rED3+301.

The images were constructed with Pymol software on the base of the 1SVB structure retrieved from Protein Data Bank.

Получение рекомбинантных белков. Бактерии *Escherichia coli* HB2151, трансформированные соответствующей плазмидной ДНК, растили в среде LB с добавлением ампициллина и 0.1 % глюкозы при скорости перемешивания 180 об./мин и температуре 37 °С. При достижении оптической плотности $OD_{600} = 0.7–0.9$ синтез белка индуцировали добавлением ИПТГ до конечной концентрации 0.5 mM, а рост культуры продолжали при скорости перемешивания 180 об./мин и 30 °С. Через 4 ч биомассу отделяли от культуральной жидкости центрифугированием 10 мин при 6000 g, осадок ресуспендировали в буфере, содержащем 20 % сахарозы, 1 mM ЭДТА и 10 mM трис-HCl, pH 7.5, взятом в количестве 1/10 исходного объема жидкой культуры. После инкубации 5 мин при комнатной температуре и 5 мин при 0 °С клетки осаждали 2 мин при 10000 g и температуре 6 °С. После удаления супернатанта клеточный осадок ресуспендировали в 5 mM растворе $MgSO_4$, взятом в количестве 1/10 исходного объема жидкой культуры, и инкубировали 5 мин при 0 °С. Образовавшиеся сферопласты осаждали 2 мин при 10000 g и температуре 6 °С, а супернатант, содержащий периплазматические белки, фильтровали через полиэфирсульфоновый фильтр с размером пор 0.22 мкм и замораживали. Осадок сферопластов также замораживали.

При получении gED3_294 либо gED3_301 фракцию периплазматических белков наносили на хроматографическую колонку, упакованную 4 мл Ni-NTA агарозы (Novagen) со скоростью потока 0.5 мл/мин. Для промывки колонки и элюции использовали фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБР) с добавлением NaCl до 300 mM, содержащий различные концентрации имидазола. После нанесения периплазматической фракции хроматографическую колонку промывали 5 объемами буфера, не содержащего имидазола. Неспецифически связавшиеся белки элюировали буфером с 25 mM имидазола, после чего целевой белок элюировали буфером с 300 mM имидазола. С помощью фильтров Amicon ultra-4 с порогом отсеивания 3 кДа осуществляли диафильтрацию буфера и

концентрирование белка до 2–4 мг/мл. Белок фильтровали через фильтр с размером пор 0.22 мкм и хранили при 4 °С в фосфатно-солевом буферном растворе, pH 7.4, с добавлением 0.02 % азида натрия.

При получении белков gE и gED1+2 использовали осадок сферопластов, оставшийся после выделения периплазматических белков. Осадок подвергали обработке ультразвуком в течение 3 мин, после чего суспензию центрифугировали 15 мин при 12000 g. Супернатант, содержащий цитоплазматические белки, замораживали. Осадок, представляющий собой клеточный дебрис, растворяли в ФСБР, содержащем 8 M мочевины, при комнатной температуре в течение 30 мин, затем центрифугировали 15 мин при 12000 g. Целевой белок выделяли из супернатанта аффинной хроматографией аналогично тому, как это делали для белков gED3_294 и gED3_301, с тем лишь исключением, что все растворы содержали 8 M мочевины. Белки хранили в ФСБР, содержащем 8 M мочевины, при –20 °С.

Вестерн-блот анализ рекомбинантных белков. Клеточные лизаты и фракции периплазматических белков фракционировали электрофорезом в 15 % денатурирующем полиакриламидном геле, после чего белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad) электропереносом в буфере, содержащем 25 mM трис, 192 mM глицина, 0.1 % додецилсульфат натрия и 20 % этанол, и окрашивали красителем «пунцовый S». Последующие стадии осуществляли в термостатируемом шейкере при 37 °С. Мембрану блокировали 5 % суспензией обезжиренного сухого молока в течение 45 мин. После трехкратного промывания мембраны ФСБР, содержащим 0.05 % твин-20 (ФСБР-твин), к мембране добавляли раствор антитела 6x-His Tag Monoclonal Antibody (4A12E4) (Invitrogen), разведенного в том же буфере в соотношении 1:10000. После 45-минутной инкубации и трехкратного промывания мембраны ФСБР-твин к мембране добавляли раствор вторичного антитела, конъюгированного с щелочной фосфатазой, Anti-Mouse IgG (Fc specific)–Alkaline

Phosphatase antibody produced in goat, A1418 (Sigma). После 45-минутной инкубации и трехкратного промывания мембраны ФСБР-твин мембрану промывали AP-буфером (100 мМ трис-HCl, pH 9.5, 100 мМ NaCl и 10 мМ MgCl₂) и производили окрашивание мембраны раствором хромогенов BCIP-T (пара-толуидиновая соль 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфата) (Fermentas) и NBT (nitro blue tetrazolium chloride) (Fermentas) в том же буфере до появления окраски. Окрашенную мембрану промывали дистиллятом и сканировали.

В случае вестерн-блот анализа с использованием антитела ch14D5a процедуру осуществляли аналогично, при этом антитело ch14D5a применяли в конечной концентрации 1 мкг/мл, а в качестве вторичного антитела использовали Anti-Human IgG (whole molecule)–Alkaline Phosphatase antibody produced in goat, A1543 (Sigma).

Исследование взаимодействия антитела ch14D5a и его Fab-фрагмента с рекомбинантными фрагментами гликопротеина E на оптическом биосенсоре ProteOn XPR36. Эксперименты проводили в ФРСБ с добавлением 0.005 % твин-20 и 0.1 мМ этилендиаминтетраацетата натрия (ЭДТА). Поверхность HTG-чипа активировали пропусканием 1 мМ водного раствора Ni(NO₃)₂ в течение 120 с. Рекомбинантные белки нековалентно иммобилизовали на поверхности HTG-чипа в концентрации 3 мкг/мл до достижения уровня сигнала 50–70 ед. отклика. Последовательные трехкратные разведения Fab-фрагмента антитела ch14D5a в концентрации 260, 87, 29, 9.6 и 3.2 нМ анализировали на связывание с рекомбинантными белками. В качестве референсного был взят сигнал, зарегистрированный для буфера, не содержащего Fab-фрагмента, а также сигнал, полученный при пропускании разведений Fab-фрагмента в той части чипа, где не было иммобилизовано белков. Скорректированный таким образом сигнал использовали для вычисления кинетических и равновесных констант методом глобального выравнивания на основе простой модели односайтового связывания с помощью программного обеспечения ProteOn Manager 3.1.0. В случае антитела ch14D5a анализировали трехкратные разведения антитела в концентрации 81, 27, 9, 3 и 1 нМ.

Гель-фильтрационная хроматография. Хроматографический профиль образцов белков gED3_294 и gED3_301 был проанализирован на колонке Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) с помощью хроматографа AKTA pure (GE Healthcare). Профильтрованный образец белка вносили в количестве 100 мкл и фракционировали со скоростью потока 0.5 мл/мин. Оптическую плотность на выходе из колонки анализировали на длинах волн 214 и 280 нм. В качестве референсных белков были использованы РНКаза А (13.7 кДа), лизоцим куриных яиц (14.3 кДа) и одноцепочечное антитело 14D5 (27 кДа). Эксперименты проводили в буфере ФСБР.

Обработка дебриса детергентом. Клеточный дебрис, оставшийся в результате центрифугирования бактерий, предварительно обработанных ультразвуком, ресуспендировали в буфере (50 мМ трис-HCl, pH 7.5, 1 мМ ЭДТА, 150 мМ NaCl), содержащем 0.5 %, 1 % или 1.5 % детергента тритон ×100. Образцы инкубировали в течение ночи при 4 °C. Центрифугировали 10 мин при 12000 g,

анализировали осадок и супернатант денатурирующим электрофорезом в полиакриламидном геле.

Результаты

Получение рекомбинантных фрагментов гликопротеина E ВКЭ

Рекомбинантные фрагменты гликопротеина E были разработаны в результате экспрессии в бактериях *E. coli* HB2151. Для этого были сконструированы плазмидные ДНК на основе ДНК pHEN2, содержащей сигнальную последовательность гена пектат-лиазы В (pelB). Эта последовательность направляет синтез белка в периплазматическое пространство *E. coli*, которое обладает более высоким окислительным потенциалом, а также содержит белки клеточной системы Dsb, способствующие образованию дисульфидных связей, необходимых для стабилизации пространственной структуры белка (Berkmen, 2012), что способствует образованию правильной конформации белковой молекулы и накоплению белка в растворимой форме. Всего было сконструировано четыре рекомбинантных фрагмента гликопротеина E: 1) белок gE, содержащий домены D1, D2 и D3, аминокислотные остатки (а.к.о.) 1–397 гликопротеина E ВКЭ; 2) белок gED1+2, содержащий домены D1 и D2 (а.к.о. 1–302 гликопротеина E); 3) белок gED3_301, представляющий собой домен D3 (а.к.о. 301–397 гликопротеина E); 4) белок gED3_294 (а.к.о. 294–397 гликопротеина E), включающий домен D3 и шарнирный участок, соединяющий домены D1 и D3. Все рекомбинантные белки содержали гексагистидиновую последовательность на С-конце и не содержали С-концевой трансмембранный участок (а.к.о. 398–496). На рис. 1 представлены соответствующие фрагменты пространственной структуры эктодомена гликопротеина E (Rey et al., 1995, PDB_id: 1SVB).

В результате индукции бактерий, трансформированных соответствующими плазмидными ДНК, были получены клеточные лизаты, содержащие необходимые белки. Белки фракционировали гель-электрофорезом в восстановительных условиях (рис. 2, а) и выявляли антителом против гексагистидиновой последовательности в вестерн-блот анализе для соотнесения полос на геле целевым белкам (см. рис. 2, б). Белки gED3_294 и gED3_301 находились в растворимом виде в периплазматическом пространстве клеток (см. рис. 2, а, дорожки 1 и 2). Белок gE присутствовал в небольшом количестве в цитоплазме клеток в растворимом виде и выявлялся вестерн-блот анализом антителом против гексагистидиновой последовательности (см. рис. 2, б, дорожка б). Вместе с тем большая часть белков gE и gED1+2 была расположена в клеточном дебрисе, оставшемся после выделения периплазмы и цитоплазмы (см. рис. 2, а, дорожки 3 и 4). Кроме того, зарегистрированы в небольшом количестве дополнительные формы белков gED3_294 и gE, незначительно отличающиеся по электрофоретической подвижности. Присутствие этих форм может быть вызвано неполным отщеплением лидерного пептида от целевого белка.

Была проверена гипотеза о том, что белки gED1+2 и gE находятся преимущественно в нерастворимом виде из-за того, что они связаны с фрагментами бактериаль-

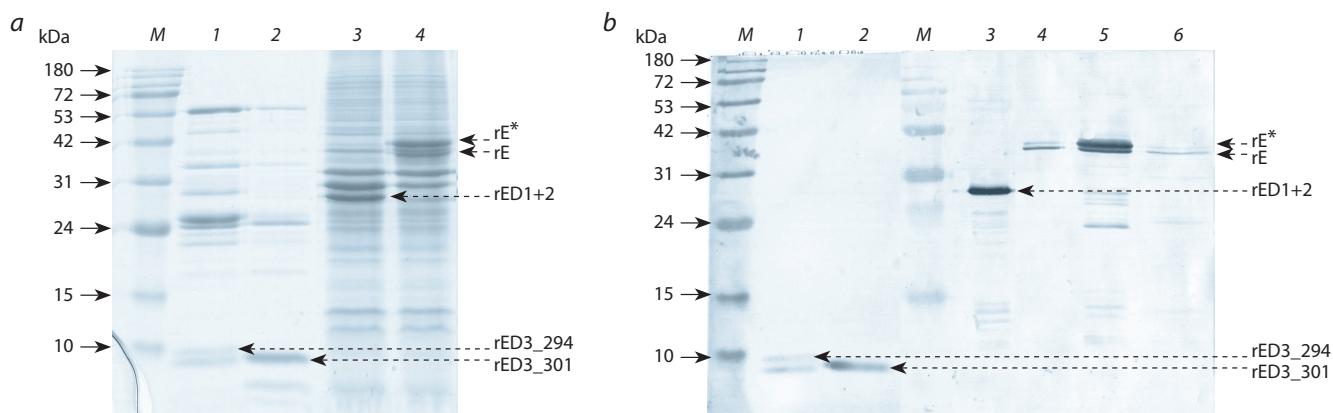


Fig. 2. Analysis of cell fractions containing recombinant proteins rED3_294, rED3_301, rED1+2, and rE: (a) electrophoresis in 15 % denaturing polyacrylamide gel, (b) Western blotting with antibody against the hexahistidine fragment.

1, 2, Periplasmic fraction of bacteria transformed with plasmids pHEN2-rED3_294 and pHEN2-rED3_301, respectively; (3) cell debris of bacteria transformed with pHEN2-rED1+2; 4, 5, cell debris of bacteria transformed with pHEN2-rE; 6, cytoplasmic fraction of bacteria transformed with pHEN2-rE; M, protein molecular weight ladder. All samples were prepared with the presence of dithiothreitol.

ной мембраны при помощи гидрофобной петли слияния (а.к.о. 98–111 гликопротеина Е), расположенной в домене D2. Однако после обработки клеточного дебриса буфером, содержащим 0.5 %, 1 % или 1.5 % тритона $\times 100$, белки rED1+2 и rE по-прежнему находились в осадке и не переходили в супернатант.

Белки rED3_294 и rED3_301 были выделены из периплазматической фракции Ni-NTA хроматографией. Методом гель-фильтрационной хроматографии в отсутствие детергентов было показано, что белки rED3_294 и rED3_301 соответствовали по времени удержания на колонке белкам с молекулярной массой около 12 кДа, следовательно, эти белки находились в растворе в виде мономеров и не образовывали агрегатов.

Анализ связывания рекомбинантных белков rED3_294, rED3_301, rED1+2 и rE с антителом ch14D5a

Полученные белки в виде клеточных лизатов и периплазматических фракций были исследованы вестерн-блот анализом на специфическое связывание с антителом ch14D5a. В результате обнаружено, что антитело связывается с белками rED3_294, rED3_301 и rE, но не связывается с белком rED1+2 (рис. 3). Это свидетельствует о том, что эпитоп, узнаваемый антителом ch14D5a, расположен на домене D3 гликопротеина Е ВКЭ, причем шарнирный участок, соединяющий домены D1 и D3, не принимает участия во взаимодействии с антителом ch14D5a.

Сродство антитела ch14D5a и Fab-фрагмента этого антитела к белкам rED3_294 и rED3_301 было измерено с помощью оптического биосенсора ProteOn XPR 36 (Bio-Rad), использующего явление поверхностного плазмонного резонанса (рис. 4). Белки rED3_294 и rED3_301 иммобилизовали на поверхность чипа и анализировали их связывание с антителом ch14D5a и его Fab-фрагментом. В случае взаимодействия с Fab-фрагментом измеряли аффинность, которая для белков rED3_294 и rED3_301 составила 53 ± 3 и 48 ± 3 нМ соответственно (см. рис. 4, а, б). В случае антитела ch14D5a измеряли значение кажущейся (эффективной) константы диссоциации, называемой так-

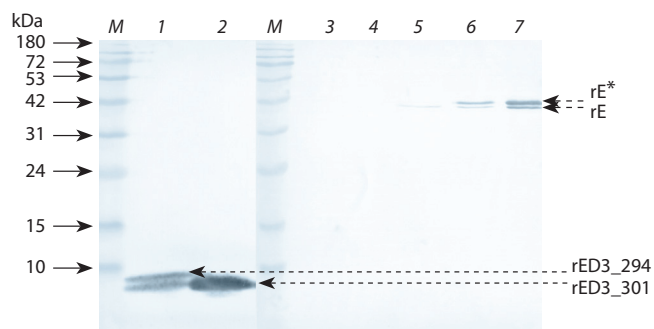


Fig. 3. Western blotting of recombinant proteins with antibody ch14D5a. 1, rED3_294; 2, rED3_301; 3, 4, rED1+2; 5–7, rE; M, protein molecular weight ladder. Proteins were resolved in reducing 15 % polyacrylamide gel and transferred to a nitrocellulose membrane.

же avidностью, которая характеризует взаимодействие полноразмерного антитела, имеющего два антигенсвязывающих домена, с поверхностью, покрытой множеством молекул антигена. Полученное значение кажущейся (эффективной) константы диссоциации составило для обоих вариантов домена D3 около 1.5 ± 0.2 нМ (см. рис. 4, в).

Чтобы оценить вклад доменов D1 и D2 в связывание антитела ch14D5a с гликопротеином Е, мы исследовали взаимодействие Fab-фрагмента этого антитела с белком rE, содержащим все три домена. Полученное значение константы диссоциации находилось на уровне сродства Fab-фрагмента к белкам rED3_294 и rED3_301 и составило 45 ± 3 нМ (см. рис. 4, з), что свидетельствует об отсутствии значимого вклада доменов D1 и D2 в связывание антитела с гликопротеином Е.

Стабильность белка

Хранение белков rED3_294 и rED3_301 в течение года при 4 °C в концентрации 2–4 мг/мл в фосфатно-солевом буфере с добавлением азида натрия не приводило ни к выпадению осадка, ни к изменению активности белка.

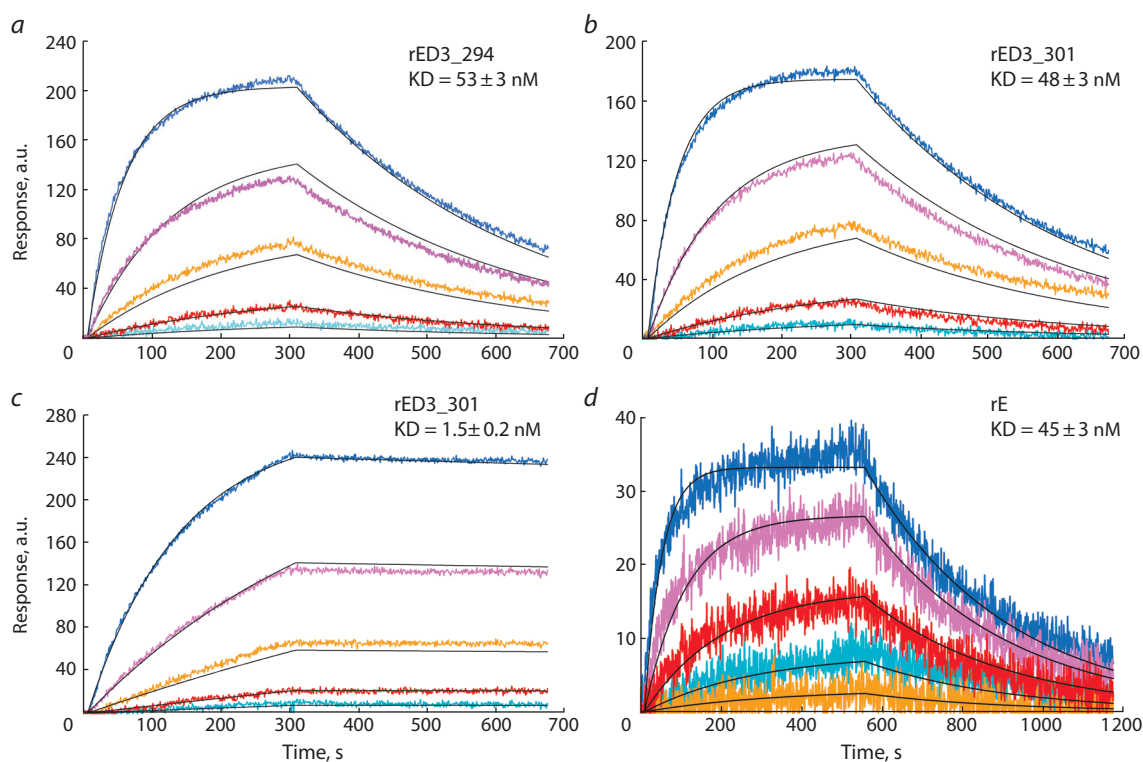


Fig. 4. (a, b, d) Binding of the Fab fragment of antibody ch14D5a to proteins (a) rED3_294, (b) rED3_301, and (d) rE. (c) Binding of antibody ch14D5a to protein rED3_301.

KD – dissociation constant.

Обсуждение

Домен D3 гликопротеина Е флавивирусов по пространственной структуре относится к семейству иммуноглобулиновых доменов. Это достаточно стабильный домен, дополнительно стабилизированный одной консервативной дисульфидной связью. Рекombинантные белки, представляющие собой домены D3 некоторых флавивирусов, таких как вирус желтой лихорадки, вирус Денге, вирус западного Нила и вирус Лангат, были получены в бактериальных системах экспрессии как в виде телец включения с последующим рефолдингом белка (Volk et al., 2009; Elahi et al., 2014; Kulkarni et al., 2016), так и в растворимом виде в формате белков слияния (White et al., 2003; Volk et al., 2006; Maillard et al., 2008). В случае периплазматической экспрессии домены D3 вируса японского энцефалита и вируса лихорадки Денге были получены в нативной конформации без рефолдинга и отщепления белка-носителя (Wu et al., 2003; Lisova et al., 2007; Yang et al., 2012).

Для вируса клещевого энцефалита известны всего две работы по конструированию рекомбинантного домена D3. В одной из них белок D3 образовывался в растворимом виде, однако аминокислотная последовательность этого белка соответствовала штамму Найдорф европейского подтипа ВКЭ (Jarmer et al., 2014) и отличалась от последовательности штамма Софьин дальневосточного подтипа, использованной в нашем исследовании. В другой работе рекомбинантные домены D3 были получены для штаммов европейского, сибирского и дальневосточного подтипов ВКЭ, однако белки образовывали тельца включения (Ershova et al., 2016), что, как правило, вызвано нарушением фолдинга белка (Fink, 1998; Carrió, Villaverde, 2005).

В нашем случае требовалось получить растворимый мономерный белок, пространственная структура которого была бы максимально приближена к структуре домена D3 природного гликопротеина Е ВКЭ, поэтому была выбрана система бактериальной экспрессии с транслокацией белка в периплазматическое пространство клеток за счет лидерного пептида пектат-лиазы В (pelB). В результате оба варианта домена D3, rED3_294 и rED3_301, были получены без применения хаотропных агентов и рефолдинга, а растворимость и мономерность сконструированных белков были подтверждены гель-фильтрацией.

Для получения белка гЕ, представляющего собой эктодомен гликопротеина Е ВКЭ, мы также использовали лидерный сигнал pelB, направляющий синтез в периплазму, и относительно слабый lac промотор. Это делалось с целью снижения эффективности транскрипции и уменьшения вероятности образования телец включения. Тем не менее белок гЕ присутствовал в растворимой форме лишь в небольшом количестве, в то время как основная часть белка присутствовала в клеточном дебрисе предположительно в виде телец включения. Вместе с тем полученный белок однозначно выявлялся исследуемым антителом ch14D5a в вестерн-блот анализе, что совместно с другими наблюдениями позволило нам локализовать эпитоп этого антитела с точностью до домена.

Созданные нами белки были использованы для выявления домена гликопротеина Е вируса клещевого энцефалита, узнаваемого антителом ch14D5a, на основе которого разрабатывается терапевтический препарат. Оба варианта rED3_294 и rED3_301, отличающиеся N-концевой частью, показали сходное сродство к антителу ch14D5a и

Fab-фрагменту этого антитела, из чего мы заключили, что область с 294 по 300 а.к.о. гликопротеина Е, которая отсутствует в белке gED3_301, не вносит существенного вклада в связывание антитела ch14D5a с гликопротеином Е ВКЭ и не входит в состав эпитопа, узнаваемого этим антителом.

Поскольку известны вируснейтрализующие антитела к гликопротеину Е флавивирусов, эпитоп которых расположен на нескольких доменах одновременно (de Alwis et al., 2012; Sun et al., 2017), было необходимо проверить, связывается ли антитело ch14D5a с доменами D1 или D2. Вестерн-блот анализ с использованием белка gED1+2 не выявил связывания антитела с этим белком. Белок gE, отличающийся от белка gED1+2 только наличием домена D3, однозначно выявлялся антителом ch14D5a. Кроме того, сродство Fab-фрагмента антитела ch14D5a к домену D3, измеренное с помощью биосенсора ProteOn, оказалось очень близко по величине к сродству этого же Fab-фрагмента к белку gE, содержащему все три домена (D1, D2 и D3) гликопротеина Е ВКЭ. То есть присутствие доменов D1/D2 не усиливало взаимодействия антитела с антигеном. На основании этих данных можно заключить, что эпитоп, узнаваемый антителом ch14D5a, полностью находится в составе домена D3 и не перекрывается с доменами D1 и D2.

Ранее при исследовании мышиных и человеческих антител, образующихся в результате иммунного ответа на флавивирусные инфекции, было установлено, что антитела, направленные на домен D3, обладают рядом преимуществ по сравнению с антителами, направленными на другие участки гликопротеина Е (Roehrig, 2003; Oliphant et al., 2005; Sánchez et al., 2005; Dai et al., 2016). С одной стороны, эти антитела, как правило, обладают высокой вируснейтрализующей и протективной активностью, что может быть вызвано их способностью блокировать взаимодействие домена D3 с клеточными рецепторами. С другой стороны, антитела против домена D3 не склонны вызывать антителозависимое усиление инфекции, тогда как антитела к доменам D1 и D2, в частности антитела к петле слияния, могут усиливать инфекционность флавивирусов *in vivo* и приводить к усилению инфекции у людей (Dowd, Pierson, 2011; Halstead, 2014; Haslwanter et al., 2017; Katzelnick et al., 2017). Вместе с тем при иммунизации людей большинство образующихся антител направлено на домены D1 и D2 (Oliphant et al., 2007; Crill et al., 2009; Wahala et al., 2009; Vratskikh et al., 2013; Jarmer et al., 2014). С этой точки зрения, расположение эпитопа, узнаваемого антителом ch14D5a, в области домена D3 гликопротеина Е подчеркивает потенциальные преимущества подхода/препарата, который может быть создан на основе этого антитела, по сравнению с препаратами сывороточных антител человека против вируса клещевого энцефалита, которые преимущественно содержат антитела к доменам D1 и D2.

На основе количественных данных, полученных в экспериментах с использованием биосенсора ProteOn, взаимодействие между антителом ch14D5a и доменом D3 можно охарактеризовать как высокоаффинное. В случае антител принято разделять истинное сродство, проявляемое одним антигенсвязывающим центром, и эффективное сродство, определяемое совокупностью всех контактов антитела с антигеном. При взаимодействии противови-

русных антител с вирионом, покрытым множеством копий поверхностного белка, значение эффективной аффинности гораздо точнее характеризует прочность взаимодействия по сравнению с константой аффинности одновалентного взаимодействия (Wang, Yang, 2010). В случае антитела ch14D5a, несмотря на умеренную аффинность Fab-фрагмента этого антитела по отношению к домену D3, эффективная аффинность полноразмерного антитела находится на уровне 1.5 нМ, что в совокупности с благоприятным расположением эпитопа, узнаваемого на поверхности домена D3, обеспечивает высокую вируснейтрализующую и протективную активность этого антитела (Baykov et al., 2014).

Заключение

Получены рекомбинатные фрагменты гликопротеина Е ВКЭ, штамм Софьин, и показано, что эпитоп, узнаваемый протективным антителом ch14D5a на поверхности гликопротеина Е вируса клещевого энцефалита, расположен в области домена D3 и не перекрывается с доменами D1 и D2, содержащими эпитопы антител, обладающих повышенной способностью вызывать антителозависимое усиление инфекции. Полученные данные подтверждают перспективность использования антитела ch14D5a при создании терапевтического препарата против вируса клещевого энцефалита.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Science Foundation, project 17-74-10146.

Conflict of interest

The authors declare to have no conflict of interest.

References

- Barba-Spaeth G., Dejnirattisai W., Rouvinski A., Vaney M.C., Medits I., Sharma A., Simon-Lorière E., Sakuntabhai A., Cao-Lormeau V.M., Haouz A., England P., Stiasny K., Mongkolsapaya J., Heinz F.X., Screaton G.R., Rey F.A. Structural basis of potent Zika-dengue virus antibody cross-neutralization. *Nature*. 2016;536(7614):48-53. DOI 10.1038/nature18938.
- Baykov I.K., Matveev A.L., Stronin O.V., Ryzhikov A.B., Matveev L.E., Kasakin M.F., Richter V.A., Tikunova N.V. A protective chimeric antibody to tick-borne encephalitis virus. *Vaccine*. 2014; 32(29):3589-3594. DOI 10.1016/j.vaccine.2014.05.012.
- Berkmen M. Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 2012;82(1):240-251. DOI 10.1016/j.pep.2011.10.009.
- Carrió M.M., Villaverde A. Localization of chaperones DnaK and GroEL in bacterial inclusion bodies. *J. Bacteriol.* 2005;187(10):3599-3601.
- Chen Q. Plant-made vaccines against West Nile virus are potent, safe, and economically feasible. *Biotechnol. J.* 2015;10(5):671-680. DOI 10.1002/biot.201400428.
- Crill W.D., Hughes H.R., Delorey M.J., Chang G.J. Humoral immune responses of dengue fever patients using epitope-specific serotype-2 virus-like particle antigens. *PLoS One*. 2009;4(4):e4991. DOI 10.1371/journal.pone.0004991.
- Dai L., Song J., Lu X., Deng Y.Q., Musyoki A.M., Cheng H., Zhang Y., Yuan Y., Song H., Haywood J., Xiao H., Yan J., Shi Y., Qin C.F., Qi J., Gao G.F. Structures of the Zika virus envelope protein and its complex with a flavivirus broadly protective antibody. *Cell Host Microbe*. 2016;19(5):696-704. DOI 10.1016/j.chom.2016.04.013.

- de Alwis R., Smith S.A., Olivarez N.P., Messer W.B., Huynh J.P., Wahala W.M., White L.J., Diamond M.S., Baric R.S., Crowe J.E., Jr., de Silva A.M. Identification of human neutralizing antibodies that bind to complex epitopes on dengue virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012;109(19):7439-7444. DOI 10.1073/pnas.1200566109.
- Dowd K.A., Pierson T.C. Antibody-mediated neutralization of flaviviruses: a reductionist view. *Virology*. 2011;411(2):306-315. DOI 10.1016/j.virol.2010.12.020.
- Elahi M., Islam M.M., Noguchi K., Yohda M., Toh H., Kuroda Y. Computational prediction and experimental characterization of a "size switch type repacking" during the evolution of dengue envelope protein domain III (ED3). *Biochim. Biophys. Acta*. 2014;1844(3):585-592. DOI 10.1016/j.bbapap.2013.12.013.
- Ershova A.S., Gra O.A., Lyaschuk A.M., Grunina T.M., Tkachuk A.P., Bartov M.S., Savina D.M., Sergienko O.V., Galushkina Z.M., Gudov V.P., Kozlovskaya L.I., Kholodilov I.S., Gmyl L.V., Karganova G.G., Lunin V.G., Karyagina A.S., Gintsburg A.L. Recombinant domains III of Tick-Borne Encephalitis Virus envelope protein in combination with dextran and CpGs induce immune response and partial protectiveness against TBE virus infection in mice. *BMC Infect. Dis.* 2016;16(1):544.
- Fink A.L. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Fold. Des.* 1998;3(1):R9-23.
- Halstead S.B. Dengue Antibody-Dependent Enhancement: Knowns and Unknowns. *Microbiol. Spectr.* 2014;2(6). DOI 10.1128/microbiolspec.AID-0022-2014.
- Haslwanter D., Blaas D., Heinz F.X., Stiasny K. A novel mechanism of antibody-mediated enhancement of flavivirus infection. *PLoS Pathog.* 2017;13(9):e1006643. DOI 10.1371/journal.ppat.1006643.
- Holbrook M.R., Shope R.E., Barrett A.D. Use of recombinant E protein domain III-based enzyme-linked immunosorbent assays for differentiation of tick-borne encephalitis serocomplex flaviviruses from mosquito-borne flaviviruses. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42(9):4101-4110.
- Jarmer J., Zlatkovic J., Tsouchnikas G., Vratskikh O., Strauß J., Aberle J.H., Chmelik V., Kundi M., Stiasny K., Heinz F.X. Variation of the specificity of the human antibody responses after tick-borne encephalitis virus infection and vaccination. *J. Virol.* 2014;88(23):13845-13857. DOI 10.1128/JVI.02086-14.
- Katzelnick L.C., Gresh L., Halloran M.E., Mercado J.C., Kuan G., Gordon A., Balmaseda A., Harris E. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science*. 2017;358(6365):929-932. DOI 10.1126/science.aan6836.
- Kulkarni M.R., Numoto N., Ito N., Kuroda Y. Modeling and experimental assessment of a buried Leu-Ile mutation in dengue envelope domain III. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016;471(1):163-168. DOI 10.1016/j.bbrc.2016.01.159.
- Lisova O., Hardy F., Petit V., Bedouelle H. Mapping to completeness and transplantation of a group-specific, discontinuous, neutralizing epitope in the envelope protein of dengue virus. *J. Gen. Virol.* 2007;88(Pt.9):2387-2397.
- Maillard R.A., Jordan M., Beasley D.W., Barrett A.D., Lee J.C. Long range communication in the envelope protein domain III and its effect on the resistance of West Nile virus to antibody-mediated neutralization. *J. Biol. Chem.* 2008;283(1):613-622.
- Nybakken G.E., Oliphant T., Johnson S., Burke S., Diamond M.S., Fremont D.H. Structural basis of West Nile virus neutralization by a therapeutic antibody. *Nature*. 2005;437(7059):764-769.
- Oliphant T., Engle M., Nybakken G.E., Doane C., Johnson S., Huang L., Gorlatov S., Mehlhop E., Marri A., Chung K.M., Ebel G.D., Kramer L.D., Fremont D.H., Diamond M.S. Development of a humanized monoclonal antibody with therapeutic potential against West Nile virus. *Nat. Med.* 2005;11(5):522-530.
- Oliphant T., Nybakken G.E., Austin S.K., Xu Q., Bramson J., Loeb M., Throsby M., Fremont D.H., Pierson T.C., Diamond M.S. Induction of epitope-specific neutralizing antibodies against West Nile virus. *J. Virol.* 2007;81(21):11828-11839.
- Pierson T.C., Kielian M. Flaviviruses: braking the entering. *Curr. Opin. Virol.* 2013;3(1):3-12. DOI 10.1016/j.coviro.2012.12.001.
- Rey F.A., Heinz F.X., Mandl C., Kunz C., Harrison S.C. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature*. 1995;375(6529):291-298.
- Rey F.A., Stiasny K., Vaney M.C., Dellarole M., Heinz F.X. The bright and the dark side of human antibody responses to flaviviruses: lessons for vaccine design. *EMBO Rep.* 2018;19(2):206-224. DOI 10.15252/embr.201745302.
- Robinson L.N., Tharakaraman K., Rowley K.J., Costa V.V., Chan K.R., Wong Y.H., Ong L.C., Tan H.C., Koch T., Cain D., Kirloskar R., Viswanathan K., Liew C.W., Tissire H., Ramakrishnan B., Myette J.R., Babcock G.J., Sasisekharan V., Alonso S., Chen J., Les-car J., Shriver Z., Ooi E.E., Sasisekharan R. Structure-guided design of an anti-dengue antibody directed to a non-immunodominant epitope. *Cell*. 2015;162(3):493-504. DOI 10.1016/j.cell.2015.06.057.
- Roehrig J.T. Antigenic structure of flavivirus proteins. *Adv. Virus Res.* 2003;59:141-175.
- Sánchez M.D., Pierson T.C., McAllister D., Hanna S.L., Puffer B.A., Valentine L.E., Murtadha M.M., Hoxie J.A., Doms R.W. Characterization of neutralizing antibodies to West Nile virus. *Virology*. 2005;336(1):70-82.
- Sun H., Chen Q., Lai H. Development of antibody therapeutics against flaviviruses. *Int. J. Mol. Sci.* 2017;19(1). pii: E54. DOI 10.3390/ijms19010054.
- Tikunova N.V., Matveev A.L., Baykov I.K., Khlusevich Y.A., Stornin O.V., Bondarenko D.A., Murashev A.N. Preclinical study of a preparation developed on the base of chimeric antibody against tick-borne encephalitis virus. *Trudy Instituta Poliomieliita i Virusnykh Entsefalitov im. M.P. Chumakova RAMN. Meditsinskaya Virusologiya = Medical Virology (Moscow)*. 2015;29(2):111. (in Russian)
- Tsekhonovskaya N.A., Matveev L.E., Rubin S.G., Karavanov A.S., Pressman E.K. Epitope analysis of tick-borne encephalitis (TBE) complex viruses using monoclonal antibodies to envelope glycoprotein of TBE virus (persulcatus subtype). *Virus Res.* 1993;30(1):1-16.
- Volk D.E., Chavez L., Beasley D.W., Barrett A.D., Holbrook M.R., Gorenstein D.G. Structure of the envelope protein domain III of Omsk hemorrhagic fever virus. *Virology*. 2006;351(1):188-195.
- Volk D.E., May F.J., Gandham S.H., Anderson A., Von Lindern J.J., Beasley D.W., Barrett A.D., Gorenstein D.G. Structure of yellow fever virus envelope protein domain III. *Virology*. 2009;394(1):12-18. DOI 10.1016/j.virol.2009.09.001.
- Vratskikh O., Stiasny K., Zlatkovic J., Tsouchnikas G., Jarmer J., Kar-rer U., Roggendorf M., Roggendorf H., Allwinn R., Heinz F.X. Dissection of antibody specificities induced by yellow fever vaccination. *PLoS Pathog.* 2013;9(6):e1003458. DOI 10.1371/journal.ppat.1003458.
- Wahala W.M., Kraus A.A., Haymore L.B., Accavitti-Loper M.A., de Silva A.M. Dengue virus neutralization by human immune sera: role of envelope protein domain III-reactive antibody. *Virology*. 2009;392(1):103-113. DOI 10.1016/j.virol.2009.06.037.
- Wang J., Bardelli M., Espinosa D.A., Pedotti M., Ng T.S., Bianchi S., Simonelli L., Lim E.X.Y., Foglierini M., Zatta F., Jaconi S., Beltramel-lo M., Camerini E., Fibriansah G., Shi J., Barca T., Pagani I., Rubio A., Broccoli V., Vicenzi E., Graham V., Pullan S., Dowall S., Hewson R., Jurt S., Zerbe O., Stettler K., Lanzavecchia A., Sallusto F., Cavalli A., Harris E., Lok S.M., Varani L., Corti D. A human Bi-specific antibody against Zika virus with high therapeutic potential. *Cell*. 2017;171(1):229-241.e15. DOI 10.1016/j.cell.2017.09.002.
- Wang P., Yang X. Neutralization efficiency is greatly enhanced by bi-valent binding of an antibody to epitopes in the V4 region and the membrane-proximal external region within one trimer of human immunodeficiency virus type 1 glycoproteins. *J. Virol.* 2010;84(14):7114-7123. DOI 10.1128/JVI.00545-10.
- White M.A., Liu D., Holbrook M.R., Shope R.E., Barrett A.D., Fox R.O. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis

- of Langkat virus envelope protein domain III. *Acta Crystallogr.* 2003; D59:1049-1051. DOI 10.1107/S0907444903004475.
- Wu K.P., Wu C.W., Tsao Y.P., Kuo T.W., Lou Y.C., Lin C.W., Wu S.C., Cheng J.W. Structural basis of a flavivirus recognized by its neutralizing antibody: solution structure of the domain III of the Japanese encephalitis virus envelope protein. *J. Biol. Chem.* 2003;278(46):46007-46013.
- Yang J., Zhang J., Chen W., Hu Z., Zhu J., Fang X., Yuan W., Li M., Hu X., Tan Y., Hu F., Rao X. Eliciting cross-neutralizing antibodies in mice challenged with a dengue virus envelope domain III expressed in *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* 2012;58(4):369-380. DOI 10.1139/w11-137.
- Zhao H., Fernandez E., Dowd K.A., Speer S.D., Platt D.J., Gorman M.J., Govero J., Nelson C.A., Pierson T.C., Diamond M.S., Fremont D.H. Structural basis of Zika virus-specific antibody protection. *Cell.* 2016;166(4):1016-1027. DOI 10.1016/j.cell.2016.07.020.
- Zidane N., Dussart P., Breman L., Bedouelle H. Cross-reactivities between human IgMs and the four serotypes of dengue virus as probed with artificial homodimers of domain-III from the envelope proteins. *BMC Infect. Dis.* 2013;13:302. DOI 10.1186/1471-2334-13-302.

Phenetic analysis of *Populus nigra*, *P. laurifolia* and *P. × jrtyschensis* in natural hybridization zone

A.V. Klimov¹✉, B.V. Proshkin²

¹ Novokuznetsk Branch of Kemerovo State University, Novokuznetsk, Russia

² Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

The wide spread of hybridization in the genus *Populus*, including spontaneous hybridization, caused by cultivars, requires studying the variability and inheritance of morphological traits by hybrids for initial tracking of these processes. The analysis of endogenous, intra- and inter-population variability was performed on 533 individual poplar trees in seven populations of *P. nigra*, seven populations of *P. laurifolia* and four populations of *P. × jrtyschensis* in the Tom river basin. On each specimen, 15 leaves from short mid-crown branches were collected to determine the shape of the leaf blade, the shape of its tip and base, as well as the branch morphotype. Some biometric indicators were proposed for geometric assessment of the leaf blade shapes of poplar species. The analysis showed that of all the traits examined only the leaf blade shape did not meet the criterion for “phene”, since it is usually represented by several forms in the crown of one and the same tree. In all the species studied, the level of their intra-population diversity was found to be much higher than the inter-population one. According to the increase of intra-population variability of qualitative traits, the taxa could be ranked as *P. nigra* < *P. laurifolia* < *P. × jrtyschensis*. The share of inter-population diversity differed among the species studied, accounting for 21.5% in *P. laurifolia*, 13.8% in *P. nigra* and 8.0% in *P. × jrtyschensis*. The *P. laurifolia* populations showed the greatest inter-population differentiation, most likely because of a disjunct distribution due to narrow specialization to the montane river environment. The lower differentiation in *P. nigra* is probably due to the facts that this species dominates the poplar stands of the Tom River basin; its populations are not fragmented and are linked by vast gene flow. In *P. nigra*, an increase in the diversity of qualitative characteristics and phenotypes was observed in populations confined to hybridization centers. Natural selection is most likely the factor governing the inter-population differentiation in *P. × jrtyschensis*, leading to the predominance of F₁ hybrids in populations and hence to a sharp decrease in inter-population variability.

Key words: *Populus*; hybrids; qualitative traits; morphological markers; morphometry; phenotypic diversity.

Фенетический анализ *Populus nigra*, *P. laurifolia* и *P. × jrtyschensis* в зоне гибридизации

А.В. Климов¹✉, Б.В. Прошкин²

¹ Новокузнецкий институт (филиал) Кемеровского государственного университета, Новокузнецк, Россия

² Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

Широкое распространение гибридизации в роде *Populus*, в том числе спонтанной, вызванной использованием культиваров, требует изучения изменчивости и наследования морфологических признаков гибридами для первичного отслеживания этих процессов. Анализ эндогенной, внутри- и межпопуляционной изменчивости выполнен на 533 особях в семи популяциях *P. nigra*, семи – *P. laurifolia* и четырех – *P. × jrtyschensis* бассейна реки Томи. На каждой особи на 15 листьях с укороченных побегов в средней части кроны исследовались: форма листовой пластинки, форма ее верхушки, основания и морфотип побегов. Предложен вариант использования биометрических показателей для геометрической оценки формы листовой пластинки видов тополя. Проведенный анализ показывает, что из исследованных признаков критерию фена не соответствует только форма пластинки, поскольку обычно представлена несколькими типами в кроне одного дерева. У всех изученных видов уровень их внутрипопуляционного разнообразия значительно выше межпопуляционного. По нарастанию внутрипопуляционной изменчивости по качественным признакам таксоны располагаются в следующем порядке *P. nigra* < *P. laurifolia* < *P. × jrtyschensis*. Доля межпопуляционного разнообразия отличается у исследованных видов: *P. laurifolia* – 21.5 %, *P. nigra* – 13.8 %, *P. × jrtyschensis* – 8.0 %. Популяции *P. laurifolia* отличаются наибольшей межпопуляционной дифференцировкой, что, вероятно, связано с дизъюнктивным распространением вида в силу узкой специализации к условиям горных рек. Меньшая дифференциации у *P. nigra* обусловлена тем, что этот вид доминирует в топольниках бассейна р. Томи, его популяции не фрагментированы и связаны между собой обширным потоком генов. У *P. nigra* наблюдается увеличение разнообразия качественных признаков и фенотипов в популяциях, приуроченных к очагам гибридизации. Фактором, определяющим межпопуляционную диффе-

ренцировку у *P. × jrtyschensis*, является действие отбора, приводящего к преобладанию в популяциях гибридов F_1 , что ведет к резкому снижению межпопуляционной изменчивости.

Ключевые слова: *Populus*; гибриды; качественные признаки; морфологические маркеры; морфометрия; фенотипическое разнообразие.

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Klimov A.V., Proshkin B.V. Phenetic analysis of *Populus nigra*, *P. laurifolia* and *P. × jrtyschensis* in natural hybridization zone. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(4):468-475. DOI 10.18699/VJ18.384

The hybridization process, which is quite common among the *Populus* species, increases morphological diversity and often seriously impedes taxon attribution. The latter is especially important as the use of adventitious species and cultivars for parking and afforestation resulted in spreading of spontaneous hybridization (Meirmans et al., 2010; Thompson et al., 2010; Talbot et al., 2012; Vanden Broeck et al., 2012; Roe et al., 2014; Hu et al., 2017). The threat of genetic contamination of natural populations of aboriginal species via uncontrolled interbreeding with subsequent introgression urges for extensive studies of variability and inheritance of morphological traits, caused by poplars' hybridization. Molecular markers are the best tools to identify hybrids; however, the primary screening of these processes in populations should be based on phenetic data, which will also facilitate and focus phenetic studies.

In Siberian areas, where *P. laurifolia* (Tacamahaca Mill. section) and *P. nigra* (Aigeiros Lunell section) grow together, their natural hybridization resulted in the emergence of the hybrid taxon named *P. × jrtyschensis* Ch. Y. Yang. Previously, we studied some quantitative and qualitative traits of these species, as well as their asymmetrical hybridization in the Tom River basin (Klimov, Proshkin, 2016, 2017; Proshkin, Klimov, 2017a).

The aim of the present study was to analyze the diversity of qualitative traits of *P. nigra*, *P. laurifolia* and *P. × jrtyschensis* in the area of their natural hybridization according to the "phene" criteria.

Materials and methods

The variability of morphological traits was analyzed in poplar populations along the up- and mid-stream Tom River (Table 1). The Tom River is the right tributary of the Ob River, with its mouth at the 68 m a.s.l. located at 56°50'00"N and 84°29'20"E. The Tom River begins in the south of the Kuznetsk Alatau Mountains in the area where they join the Abakan Ridge, its source being at 903 a.s.l. at 53°39'05"N; 89°45'50"E. The river basin is located at the bound of the West Siberian Lowland and the Altai-Sayan Mountains. The valley of the up-stream Tom River is deeply cut with a V-shaped profile and the width exceeding 1 km. The valley slopes are high and steep. The average altitude of the water-collecting area is 900 m, with altitude amplitudes exceeding 600 m. In the environs of the Mezhdurechensk town after merging with the Usa River the Tom River valley widens to 3–4 km. In mid-stream areas below the Novokuznetsk city, the Tom River

becomes a typical plain river, albeit with sometimes increased inclines and stream flow speed. Such large tributaries as the Belsu River (83 km long), the Usa River (179 km long), the Verkhnyaya, Srednyaya and Nizhnyaya Ters Rivers (95, 114 and 110 km, respectively), the Taidon River (110 km) and others flow into the Tom River from the west slope of the Kuznetsk Alatau. All of them are typical montane rivers with narrow valleys, rapids and a high flow speed (Zhukov, 2012).

In the Tom River basin the black poplar *P. nigra*, called "osokor" in Russian, prefers growing mostly in the plain or, to a lesser degree, in low mountain areas, while the laurel poplar *P. laurifolia* prefers highland areas. In the area of the joint growth, their natural hybridization results in the emergence of the Irtysh hybrid called *P. × jrtyschensis*. Hybridization in the basin studied does not have a wide spread character, occurring only at certain sites, which can be regarded as hybridization centers. The Irtysh poplar populations studied in the Tom River basin are of both natural and anthropogenic origin (Klimov, Proshkin, 2017).

As morphological markers to examine the intra-species structure with, we chose the traits important for identification of the poplar species studied. For each individual tree, we determined the branch morphotype. For 15 leaves sampled from the middle part of the short branches in the mid-crown of the mature trees, we determined the shape of the leaf blade, its base and tip (Proshkin, Klimov, 2017b).

For each leaf, the following characteristics were measured: L, leaf blade length (mm); D, maximal leaf blade width (mm); P, petiole length (mm); A, the distance between the widest part of a leaf blade and its base (mm). Measurements of the major morphometric traits were carried out with the help of Axio Vision 4.8.2 software. Since different studies may drastically differ in terminology employed to describe leaf characteristics, we described and determined leaf blade shape according to the patterns proposed by Fedorov et al. (1956), using the biometric characteristics obtained.

Analysis of herbaria samples as well as literature sources (Bolshakov, 1992; Koropachinsky, Vstovskaya, 2012) showed that leaves of the poplar species studied are often described as egg-shaped triangular. Because this shape is absent from Fedorov's patterns, we chose R1/2 as a point to distinguish it. To elaborate, the egg-shaped form geometrically represents an ovoid, i.e. a closed box curve with one axis of symmetry and two supporting circumferences differing in diameter (Talalay, 2011), with R1 being the radius of the bigger circumference. The R1/2 point can be easily determined on the

Table 1. The poplar populations studied

Population name	Geographical coordinates	The number of trees/leaves		
		<i>P. nigra</i>	<i>P. laurifolia</i>	<i>P. × jrtyschensis</i>
Up-stream Tom River populations				
Belsu	53°41'35" N, 88°22'44» E	–	30/450	–
Studený Ples	53°39'49" N, 88°20'01" E	–	30/450	–
Vorony	53°66'10" N, 88°29'52" E	–	30/450	–
Chistenky	53°66'19" N, 88°28'56" E	30/450	–	–
Maizas	53°37'24" N, 88°12'48" E	30/450	30/450	39/585
Kiizak	53°72'27" N, 87°94'58" E	30/450	–	–
Shveinik	53°48'34" N, 87°28'42" E	30/450	–	–
Karlyk	53°49'21" N, 87°28'03" E	–	–	41/615
Mid-stream Tom River populations				
Novokuznetsk	53°49'04" N, 87°07'23" E	30/450	–	23/345
Kazankovo	53°99'08" N, 87°29'44" E	30/450	–	–
Slavino	54°02'05" N, 87°22'55" E	30/450	–	–
Erunakovo	54°09'32" N, 87°47'45" E	–	30/450	–
Verkhnyaya Ters	54°13'00" N, 87°39'48" E	–	30/450	10/150
Srednyaya Maganakova	54°19'33" N, 87°58'57" E	–	30/450	–
Total		210/3150	210/3150	113/1695

Table 2. General characteristic of branch morphotypes

Morphotype	Description
<i>P. nigra</i>	
1Pn	Young branches are cylindrical along the entire length, the short branches are leptoblasts, branches and leaves have no hairs
2Pn	The same as above; the petiole at the base of the leaf blade has long scarce outstanding hairs
<i>P. laurifolia</i>	
1Pl	Young branches are ribbed along the entire length, the short branches are leptoblasts and discoblasts; branches have no hairs; the petiole has short scarce hairs, while the leaf blade has none
2Pl	The same as above; the petiole at the base of the leaf blade has long scarce hairs
3Pl	The same as above; branches and leaves are densely covered with short hairs
<i>P. × jrtyschensis</i>	
1P×j	Young branches are cylindrical along the entire length, the short branches are leptoblasts and discoblasts; branches and leaves have no hairs
2P×j	Young branches are ribbed along the 1/2–1/3 of their length and then cylindrical, the short branches are leptoblasts and discoblasts, branches have no or scarce hairs, the leaves along the veins are scarcely haired
3P×j	Young branches are ribbed along the entire length, the short branches are leptoblasts and discoblasts, the branches and leaves along the veins are densely haired

leaf blade by the A/L ratio (Pravdin, 1964). However, since morphology studies usually consider living variable objects rather than strict geometric forms, we analyzed leaf shapes using Fedorov's patterns (Fedorov et al., 1956), the following ranges: < 0.25, triangular; 0.25–0.35, egg-shaped triangular; 0.35–0.45, egg-shaped; 0.45–0.65, elliptic; and 0.65 >, reversed egg-shaped forms.

The branch morphotypes were determined by examining the hairiness of leaves and branches (Table 2). The degree of trichomes' development was studied using an MBS-10 stereomicroscope. Phenotype attribution of an individual tree was carried out based on the combination of morphological qualitative traits.

We used one-way ANOVA to check the differences between poplar species and their hybrids in qualitative traits, adopting the threshold as $p < 0.001$ and using principal components analysis. The intra- and inter-population variability was assessed using the indices proposed by Zhivotovsky (1991),

Putenikhin et al. (2004), and Boronnikova et al. (2009). The diversity of qualitative traits meeting the criteria of the "phene" was analyzed as recommended by Vidyakin (2004).

Statistical analyses were performed with the help of Excel and SPSS 23.0 software.

Results

The one-way ANOVA revealed statistically significant differences among the studied species in their qualitative traits; the result was also confirmed by PCA. PC1 accounted for 57.6% of the total data variance, while PC2, PC3 and PC4 accounted for 22.0%, 17.0% and 3.4% of it, respectively. PC1 is closely correlated with the shape of the leaf blade tip ($r = 0.94$, $p < 0.00001$) and branch morphotype ($r = 0.73$, $p < 0.00001$), while PC2 was correlated with the leaf blade shape ($r = 0.85$, $p < 0.00001$), and PC3 was correlated with the shape of the leaf blade base ($r = 0.57$, $p < 0.00001$). The taxa studied have four types of leaf blade shapes, namely

Table 3. Leaf blade and branch morphotype variability in poplar populations as assessed by Zhivotovsky's index ($\mu \pm s_{\mu}$)

Populations	Trait leaf blade shape	Trait leaf blade base shape	Trait leaf blade tip shape	Branch morphotype
<i>P. nigra</i>				
Chistenky	1.347 ± 0.044	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.359 ± 0.170
Maizas	1.713 ± 0.033	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.988 ± 0.028
Kiizak	1.708 ± 0.033	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.597 ± 0.146
Shveinik	1.844 ± 0.025	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.359 ± 0.170
Novokuznetsk	1.776 ± 0.029	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.960 ± 0.051
Kazankovo	1.390 ± 0.043	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.359 ± 0.170
Slavino	1.617 ± 0.037	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.495 ± 0.158
<i>P. laurifolia</i>				
Belsu	2.374 ± 0.057	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	2.496 ± 0.204
Studenyy Ples	2.289 ± 0.060	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	2.483 ± 0.206
Vorony	2.528 ± 0.051	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	2.768 ± 0.146
Maizas	2.772 ± 0.037	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	2.735 ± 0.155
Erunakovo	2.377 ± 0.057	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	2.732 ± 0.156
Verkhnyaya Ters	2.368 ± 0.057	1.960 ± 0.013	1.000 ± 0.000	2.647 ± 0.176
Srednyaya Maganakova	2.310 ± 0.059	1.798 ± 0.028	1.000 ± 0.000	2.765 ± 0.147
<i>P. × jrtyschensis</i>				
Maizas	1.990 ± 0.005	1.435 ± 0.037	1.594 ± 0.033	2.579 ± 0.166
Karlyk	2.062 ± 0.056	1.890 ± 0.058	1.425 ± 0.036	2.380 ± 0.189
Novokuznetsk	2.152 ± 0.074	2.262 ± 0.071	1.990 ± 0.007	2.390 ± 0.251
Verkhnyaya Ters	1.943 ± 0.117	1.597 ± 0.065	1.597 ± 0.065	2.893 ± 0.175

Note: μ , Zhivotovsky's index of intra-population diversity; s_{μ} , error of Zhivotovsky's index.

Table 4. Intra- and inter-population phenotypic diversity (Shannon's index)

Trait	H_{es}	H_n	F_n	F_{ip}
<i>P. nigra</i>				
LBS	0.544	0.513	0.943	0.056
LBBS	0.000	0.000	0.000	0.000
LBTS	0.000	0.000	0.000	0.000
Mt	0.671	0.535	0.796	0.203
Mean	0.304	0.262	0.862	0.138
<i>P. laurifolia</i>				
LBS	1.223	1.114	0.910	0.090
LBTS	0.836	0.404	0.483	0.517
LBTS	0.000	0.000	0.000	0.000
Mt	1.467	1.253	0.854	0.146
Mean	0.881	0.692	0.785	0.215
<i>P. × jrtyschensis</i>				
LBS	0.962	0.864	0.898	0.102
LBBS	0.549	0.539	0.981	0.019
LBTS	0.821	0.671	0.817	0.183
Mt	1.185	1.170	0.987	0.013
Mean	0.879	0.811	0.920	0.080

Notes: LBS, leaf blade shape; LBBS, leaf blade base shape; LBTS, leaf blade tip shape; Mt, branch morphotype; H_{es} , the diversity index for the entire data set; H_n , the mean value of the diversity index for populations' data sets; F_n , the diversity index of the intra-population data sets; F_{ip} , the index of the inter-population diversity.

triangular, egg-shaped triangular, egg-shaped and elliptical. At the endogenous level, different shapes can be seen at once, but one shape usually predominates.

The *P. nigra* trees were found to have triangular and egg-shaped triangular leaves, the latter predominating (78–96%) in all populations. It should be noted that 70% of the black poplar trees with the 2Pn morphotype and hairiness were found to have leaf blades of the irregular rhomboidal shape. Such trees comprised from 7 to 20% of the data set. Their A/L ratio ranged from 0.35–0.47, i.e. being typical of egg-shaped leaves, which are not common for *P. nigra*. Thus the emergence of the 2Pn morphotype is most likely due to introgression (Klimov, Proshkin, 2017), and the observed frequencies of leaf blade shapes can be regarded as a morphological marker.

The *P. laurifolia* trees were also found to have three forms of leaves: egg-shaped triangular, egg-shaped and elliptical. In most of the poplar stands studied, the egg-shaped leaves were the most frequent (50–70%). The *P. × jrtyschensis* trees were found to have all the leaf forms common for the parental

Table 5. Intra-population diversity of poplar qualitative traits and phenotypes

Population	μ_1	$S_{\mu 1}$	μ_2	$S_{\mu 2}$
<i>P. nigra</i>				
Chistenky	18.721	1.162	1.763	0.211
Maizas	22.230	1.368	2.238	0.303
Kiizak	20.891	1.288	2.588	0.370
Shveinik	20.462	1.263	2.039	0.265
Novokuznetsk	22.520	1.375	3.471	0.535
Kazankovo	18.880	1.171	1.763	0.211
Slavino	20.201	1.248	1.923	0.243
<i>P. laurifolia</i>				
Belsu	26.152	3.977	4.490	0.276
Studenyy Ples	25.897	3.930	4.862	0.429
Vorony	27.604	4.247	3.383	0.146
Maizas	28.291	4.374	5.326	0.345
Erunakovo	30.415	4.659	5.745	0.220
Verkhnyaya Ters	30.980	4.764	6.786	0.220
Srednyaya Maganakova	30.514	4.677	5.683	0.245
<i>P. × jrtyschensis</i>				
Maizas	31.505	1.001	11.614	0.842
Kiizak	30.780	1.101	7.447	0.645
Novokuznetsk	35.141	1.568	6.563	0.410
Verkhnyaya Ters	31.618	2.134	4.721	0.131

Notes: μ_1 , Zhivotovsky's index of intra-population diversity for qualitative traits; $S_{\mu 1}$, error of μ_1 ; μ_2 , Zhivotovsky's index of intra-population diversity for phenotypes; $S_{\mu 2}$, error of μ_2

species. The hybrid species populations were found to have egg-shaped triangular leaves prevailing (55–82%), with triangular and elliptical leaves showing very low frequencies.

At the individual level, the lowest variability of the leaf blade shape was observed in *P. nigra*, while the highest variability was displayed by *P. laurifolia* trees. The *P. × jrtyschensis* populations were characterized by variability indices ranging between those of the parental species (Tables 3, 4).

The short mid-crown branches on one and the same tree always display only one leaf blade tip shape and one leaf blade base shape. The *P. nigra* leaves in all the populations studied had long pointed tips and wedge-shaped bases.

The *P. laurifolia* trees had pointed leaf blade tips of all the leaves. The variability of the leaf blade base of the laurel poplar trees within the study area is due to the presence of tree forms that differ not only in the trait being examined, but also in their bark colour (Proshkin, Klimov, 2017c). The most widely spread grey-bark form has a rounded wedge-shaped base of the leaf blades, while the white-bark form,

common for mid-stream populations, has a heart-shaped leaf blade base.

The *P. × jrtyshensis* trees commonly had leaves with long pointed tips and rounded wedge-shaped bases, but few had rounded and sinuate bases. The greatest variability of the traits was observed in the Novokuznetsk population (see Table 3).

The branch morphotype did not vary at the endogenous level. Most of the *P. nigra* populations were found to have morphotype 1Pn dominating, with exceptions of the Maizas and Novokuznetsk data sets collected in the stands mixed with *P. laurifolia* and *P. × jrtyshensis*, where morphotype 2Pn contributed 56.7% and 36.7%, respectively.

P. laurifolia also showed a tendency to change the relative abundance of morphotypes in hybridization centers. For instance, the Maizas and Verkhnyaya Ters populations displayed a sharp increase in the relative abundance of morphotype 1Pl (up to 60 and 66.7%, respectively). Most poplar stands beyond the hybridization centers were dominated by trees with branches and leaves scarcely covered by long hairs.

At all the study sites for *P. × jrtyshensis*, morphotype 2P_× was predominating. The lowest variability of the traits was observed in *P. nigra*, while *P. laurifolia* and *P. × jrtyshensis* displayed similar variability (see Table 3). The species studied revealed a higher level of intra-population diversity in qualitative traits than that of inter-population diversity: its share was 21.5% in *P. laurifolia*, 13.8% in *P. nigra* and 8.0% in *P. × jrtyshensis* (see Table 4).

Assessing the inter-population variability by Zhivotovsky's index showed that qualitative traits and phenotype number were more polymorphic in *P. laurifolia* than *P. nigra*. The *P. × jrtyshensis* populations were the most diverse (Table 5).

The Maizas and Novokuznetsk *P. nigra* populations in hybridization centers displayed an increased diversity of qualitative traits and phenotypes due to an increased share of the forms with hairy leaves (see Table 5). The mid-stream *P. laurifolia* populations displayed increased polymorphism due, as we noted previously, to the presence of white-bark forms.

Discussion

Analysis of the morphological traits studied for meeting the “phene” criterion showed that the shapes of the leaf blade tip and base, as well as the branch morphotype can be regarded as phenes, since they display no endogenous variability. Although leaf blade shape as a trait does not meet all criteria of phenes, and, in particular, alternativity, when the set is rather large, the leaf blade shape becomes an important indicator of specific variability of qualitative traits of *Populus* species. Overall, the tip and base of leaf blades of *P. × jrtyshensis* represent a combination of parental taxa traits. Hybrids always inherit short branches, i.e. discoblasts, common for species in the section *Tacamahaca*. This trait is most likely controlled by nuclear genes (Proshkin, Klimov, 2017d).

A high share of intra-population variability was reported by some researchers for *P. nigra* (Šiler et al., 2014; Čortan et al., 2015; Jiang et al., 2015) and *Populus* species in general (Joshi et al., 2011). Gene flow over large distances leads to decrease in the inter-population variability of wind-pollinated

plants (Zitte et al., 2007). The floodplain poplar species have a considerable number of seeds transported by water flow (Hidalgo et al., 2010). According to the increase in intra-population variability, the poplar species studied can be ranked as *P. nigra* < *P. laurifolia* < *P. × jrtyshensis*.

A relatively small share of inter-population differentiation in *P. nigra* is very likely related to its dominance in the Tom River basin poplar stands and to the fact that its populations are not fragmented and hence are connected by vast gene flow. The *P. nigra* populations in hybridization centers have an increased diversity of qualitative traits and phenotypes.

By contrast, as was shown by our research of *P. laurifolia* carried out in the areas of the Tom, Biya and Katun River basins, this poplar species in the northwestern part of the Altai-Sayan Mountains has a disjunct distribution, resulting in an increased inter-population variability. The species preference for well-aerated gravel-boulder alluvium results in a narrower ecological amplitude of *P. laurifolia*, growing mostly in multi-stream areas of montane rivers. In our view, the growth of laurel poplar in plain areas is hampered by low oxygen in dense sandy-silt sediments there.

The laurel poplar is spread both in the up- and mid-stream areas of the Tom River. It is quite numerous up-stream, forming well-developed stands. In mid-stream areas with small alluvium, *P. laurifolia* is very scarce, growing mostly as sole clones. Its numbers increase sharply in the floodplains of the major montane tributaries of the Verkhnyaya and Srednyaya Ters Rivers. The mid-stream group of *P. laurifolia* populations is relatively separated from the up-stream populations, as not only are they rather well apart (ca. 50 km), but also the river flow in these areas is different. The up-stream Tom River flows from east to west, while the mid-stream of it flows from south to north. Taking into consideration the prevailing directions of air flow, such river flow prevents pollen transportation, leaving only one way for gene flow to link the populations, namely seed transportation via water flow, resulting in one-way gene flow. However, fragmented *P. laurifolia* populations grow mostly in the floodplains of the right montane tributaries of the Tom River, and the efficiency of such gene flow should be studied in detail.

The observed diversity of *P. laurifolia* forms, in particular, the occurrence of the white-bark form in the populations near montane tributaries of the mid-stream Tom River alongside the widely spread grey-bark form results in increased polymorphism both in qualitative traits and phenotypes. Different studies showed that spatial separation of *Populus spp.* populations is governed by historical processes, mainly by events in the Pleistocene and Holocene (Keller et al., 2010; Macaya-Sanz et al., 2012; Dewoody et al., 2015; Meirmans et al., 2017; Fan et al., 2018). Therefore, the variability of *P. laurifolia* population structure in the Tom River basin is the subject for a further extended research.

Theoretically, the highest rate of inter-population differences should be displayed by *P. × jrtyshensis*, because (1) this is the least common species; (2) its stands are fragmented; and (3) its populations are 20–100 km apart, which seriously impedes gene flow among them. However, the phenotypic structure of *P. × jrtyshensis* populations is determined by extremely strong natural selection, resulting in the prevalence of F₁ hybrids, and rejection of next-generation

hybrids and backcrosses early in ontogenesis before reproductive maturity (Jiang et al., 2016; Proshkin, Klimov, 2017a). All these lead to drastic decrease in inter-population variability. We believe that significant differences in phenotypic diversity in the *P. × jrtyschensis* populations studied are determined by population origin. They emerge at sites with disturbed vegetation cover, where selection factors and their pressure are site-specific. The Maizas and Karlyk populations grow in floodplains, but the former emerged due to the degradation of the vegetation cover by erosion and accumulation caused by streambed activity, while the latter emerged due to anthropogenic disturbance. The Verkhnyaya Ters population is under a strong influence of factors associated with streambed dynamics. The Verkhnyaya Ters River is a typical montane river with gravel-boulder alluvium prevailing. Thus the environment there is optimal for *P. laurifolia*, but unfavourable for *P. × jrtyschensis* and *P. nigra*, which results in a low population of their hybrids. The Novokuznetsk population is of anthropogenic origin; it is located on the upper fluvial terrace, where the spectrum of adverse factors might be broader, as compared to the natural populations where the main abiotic selection factors are determined by the riverbed dynamics.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Bol'shakov N.M. Salicaceae – Willow. In: Flora of Siberia. Novosibirsk: Nauka Publ., 1992;5:8-11. (in Russian)
- Boronnikova S.V., Tikhomirova N.N., Kravchenko O.A. Characterization of the gene pool of the rare medicinal species *Adonis vernalis* L. using ISSR markers. Agrarnyy Vestnik Urala = Agricultural Bulletin of the Urals. 2009;5(59):67-70. (in Russian)
- Čortan D., Tubić B., Šijačić-Nikolić M., Borota D. Variability of black poplar (*Populus nigra* L.) leaf morphology in vojvodina. Serbia Izvorni znanstveni članci = Original Scientific Papers Šumarski List. 2015;5(6):245-252.
- Dewoody J., Trewin H., Taylor G. Genetic and morphological differentiation in *Populus nigra* L.: isolation by colonization or isolation by adaptation? Mol. Ecol. 2015;24(11):2641-2655. DOI 10.1111/mec.13192.
- Fan L., Zheng H., Milne R.I., Zhang L., Mao K. Strong population bottleneck and repeated demographic expansions of *Populus adenopoda* (Salicaceae) in subtropical China. Ann. Bot. 2018;121(4):665-679. DOI 10.1093/aob/mcx198.
- Fedorov A.A., Kirpichnikov M.E., Artyushenko Z.T. Atlas on Descriptive Morphology of Higher Plants. Leaf. Moscow: AN SSSR Publ., 1956. (in Russian)
- Hidalgo E., Gonzalez-Martinez S.C., Lexer C., Heinze B. Conservation Genomics. In: Jansson S., Bhalerao R.P., Groover A.T. (Eds.). Genetics and Genomics of *Populus*. Ser. Plant Genetics and Genomics: Groups and Models. Vol. 8. Springer, 2010;349-368. DOI 10.1007/978-1-4419-1541-2_15.
- Hu J., Zhang J., Chen X., Lv J., Jia H., Zhao S., Lu M. An empirical assessment of transgene flow from a *Bt* transgenic poplar plantation. PLoS One. 2017;12(1):e0170201. DOI 10.1371/journal.pone.0170201.
- Jiang D., Feng J., Dong M., Wu G., Mao K., Liu J. Genetic origin and composition of a natural hybrid poplar *Populus × jrtyschensis* from two distantly related species. Plant Biol. 2016;16(1):88-99. DOI 10.1186/s12870-016-0776-6.
- Jiang D., Wu G., Mao K., Feng J. Structure of genetic diversity in marginal populations of black poplar (*Populus nigra* L.). Biochem. Syst. Ecol. 2015;61:297-302. DOI 10.1016/j.bse.2015.06.014.
- Joshi C.P., DiFazio S.P., Kole Ch. (Eds.). Genetics, Genomics and Breeding of Poplar. CRC Press, 2011.
- Keller S.R., Olson M.S., Silim S., Schroeder W., Tiffin P. Genomic diversity, population structure, and migration following rapid range expansion in the Balsam Poplar, *Populus balsamifera*. Mol. Ecol. 2010;19(6):1212-1226. DOI 10.1111/j.1365-294X.2010.04546.x.
- Klimov A.V., Proshkin B.V. Morphological identification of *Populus nigra* × *P. laurifolia* natural hybrids in the flood-plain of the Tom river. Sibirskiy Lesnoy Zhurnal = Siberian Journal of Forest Science. 2016;5:55-62. DOI 10.15372/SJFS20160506. (in Russian)
- Klimov A.V., Proshkin B.V. Morphotypic diversity in populations of *Populus nigra* L., *P. laurifolia* Ledeb., and *P. × jrtyschensis* Ch.Y. Yang in the zone of natural hybridization. Vestnik Tomskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology. 2017;39:58-72. DOI 10.17223/19988591/39/4. (in Russian)
- Koropachinskiy I.Yu., Vstovskaya T.N. Woody Plants of Asian Russia. Novosibirsk: Geo Publ., 2012. (in Russian)
- Macaya-Sanz D., Heuertz M., Lopez-De-Heredia U., De-Lucas A.I., Hidalgo E., Maestro C., Prada A., Alia R., Gonzalez-Martinez S.C. The Atlantic-Mediterranean watershed, river basins and glacial history shape the genetic structure of Iberian poplars. Mol. Ecol. 2012;21(14):3593-3609. DOI 10.1111/j.1365-294X.2012.05619.x.
- Meirmans P.G., Godbout J., Lamothe M., Thompson S.L., Isabel N. History rather than hybridization determines population structure and adaptation in *Populus balsamifera*. J. Evol. Biol. 2017;30(11):2044-2058. DOI 10.1111/jeb.13174.
- Meirmans P.G., Lamothe M., Gros-Louis M.C., Khata D., Perinet P., Bousquet J. Complex patterns of hybridization between exotic and native North American poplar species. Am. J. Bot. 2010;97(10):1688-1697. DOI 10.3732/ajb.0900271.
- Pravdin L.F. Scotch Pine. Moscow: Nauka Publ., 1964. (in Russian)
- Proshkin B.V., Klimov A.V. *Populus × jrtyschensis* Chang Y. Yang in the Altai-Sayan mountain country. Sistematicheskie Zametki po Materialam Gerbariya Imeni P.N. Krylova Tomskogo Gosudarstvennogo Universiteta = Systematic Notes on the Materials of P.N. Krylov Herbarium of Tomsk State University. 2017a;115:28-35. DOI 10.17223/20764103.115.5. (in Russian)
- Proshkin B.V., Klimov A.V. Hybridization of *Populus nigra* L. and *P. laurifolia* Ledeb. (Salicaceae) in the floodplain of the Tom river. Sibirskiy Lesnoy Zhurnal = Siberian Journal of Forest Science. 2017b;4:38-51. DOI 10.15372/SJFS20170404. (in Russian)
- Proshkin B.V., Klimov A.V. Variability of leaf shapes in *Populus laurifolia* Ledeb. varieties differing in bark color in the drainage area of the Tom River. Vestnik Novosibirskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Bulletin of the Novosibirsk State Agrarian University. 2017c;1:93-106. (in Russian)
- Proshkin B.V., Klimov A.V. Spontaneous hybridization of *Populus × sibirica* and *Populus nigra* in the city of Novokuznetsk (Kemerovo region). Turczaninowia. 2017d;20(4):206-218. DOI 10.14258/turczaninowia.20.4.19. (in Russian)
- Putenikhin V.P., Farukshina G.G., Shiganov Z.Kh. Sukachev Larch in the Urals: Variability and Population-Genetic Structure. Moscow: Nauka Publ., 2004. (in Russian)
- Roe A.D., MacQuarrie C.J., Gros-Louis M.C., Simpson J.D., Lamarche J., Beardmore T., Thompson S.L., Tanguay P., Isabel N. Fitness dynamics within a poplar hybrid zone: II. Impact of exotic sex on native poplars in an urban jungle. Ecol. Evol. 2014;4(10):1876-1889. DOI 10.1002/ece3.1028.
- Šiler B., Skorić M., Mišić D., Kovačević B., Jelić M., Patenković A., Kurbalija Novčić Z. Variability of European Black Poplar (*Populus nigra*) in the Danube Basin. Tomović Z., Vasić I. (Eds.). Petrovaradin: Vojvodinašume, 2014.
- Sitte P., Weiler E.W., Kadereit Y.W., Bresinsky A., Körner C. Botany. In: Evolution, Systematics and Phylogeny of Plants. Moscow: Akademiya Publ., 2007;3:58-67. (in Russian)

- Talalay P.G. Descriptive Geometry through Examples. St. Petersburg: BKhV-Petersburg Publ., 2011. (in Russian)
- Talbot P., Schroeder W.R., Bousquet J., Isabel N. When exotic poplars and native *Populus balsamifera* L. meet on the Canadian Prairies: Spontaneous hybridization and establishment of interspecific hybrids. For. Ecol. Manage. 2012;285:142-152. DOI 10.1016/j.foreco.2012.07.036.
- Thompson S.L., Lamothe M., Meirmans P.G., Perinet P., Isabel N. Repeated unidirectional introgression towards *Populus balsamifera* in contact zones of exotic and native poplars. Mol. Ecol. 2010;19(1): 132-145. DOI 10.1111/j.1365-294X.2009.04442.x.
- Vanden-Broeck A., Cox K., Villar M. Natural hybridization and potential seed set of sympatric *Populus nigra* and *Populus × canadensis* along the river IJzer in Flanders (Belgium). Plant Ecol. Evol. 2012; 145:341-349. DOI 10.5091/plecevo.2012.677.
- Vidyakin A.I. Methodical Recommendations on the Recognition of Phenotypes in Forest Woody Plants by the Example of *Pinus sylvestris* L. Voronezh, 2004. (in Russian)
- Zhivotovskiy L.A. Population Biometrics. Moscow: Nauka Publ., 1991. (in Russian)
- Zhukov I.A. Rivers of the Kemerovo Region. Novokuznetsk, 2012. (in Russian)

Использование межвидовой гибридизации в селекции адаптивных гибридов и сортов хризантемы садовой (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.)

А.И. Недолужко

Ботанический сад-институт Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

Сорта хризантемы садовой, созданные в странах дальнего и ближнего зарубежья, южных регионах России, не всегда зимостойки на юге российского Дальнего Востока, повреждаются грибными болезнями в связи с избыточным увлажнением, запаздывают со сроками цветения, а следовательно, не могут претендовать на роль коммерческих. Перспективным направлением отечественной селекции хризантемы садовой является создание нового селекционного материала на основе использования природного генофонда рода *Chrysanthemum* с целью введения в культурные сорта ценных адаптивных признаков. Исследования проводили в Ботаническом саду-институте ДВО РАН с 2000 г. Исходя из биологических, генетических особенностей и обеспеченности природными ресурсами рода *Chrysanthemum*, нами предложена стратегия получения зимостойких адаптивных гибридов и сортов хризантемы садовой с использованием межвидовой гибридизации. Объекты исследования – первые поколения межвидовых гибридов F_1 , ранее полученные автором в результате гибридизации сортов и многолетних маньчжурских и корейских высокогорных видов *Chrysanthemum*. Происходящие от разных видов и сортов гибриды F_1 скрещивали между собой для получения межгибридного потомства F_2 . Отбирали комплексно адаптивные (зимостойкие, устойчивые к *Puccinia horiana* Henn., ранозцветающие) и декоративные мультикомпонентные формы F_2 , которые привлекали в близкородственных скрещиваниях. Оценивали и отбирали потомство от близкородственных скрещиваний по адаптивным и декоративным показателям. Включение в селекционный процесс разных источников зимостойкости и устойчивости к *P. horiana* позволило усилить в F_2 и выявить в F_3 поколениях имеющиеся положительные качества. Адаптивные признаки диких видов *Chrysanthemum naktongense* Nakai, *C. coreanum* (H. Lév. et Vaniot) Nakai, *C. zawadzkii* var. *tenuisectum* Kitag., *C. leiophyllum* Nakai, *C. zawadzkii* subsp. *acutibolum* (DC.) Kitag., сформировавшиеся и закрепленные в процессе эволюции, наследовались и проявлялись в потомствах сложных межгибридных и близкородственных скрещиваний. Отобраны перспективные межвидовые и межгибридные формы с биологическими признаками, определяющими возможность возделывания в экстремальных условиях субрегиона.

Ключевые слова: *Chrysanthemum morifolium* Ramat.; дикие виды *Chrysanthemum*; межвидовая гибридизация; адаптивные признаки; российский Дальний Восток.

Use of interspecific hybridization in the breeding of adaptive hybrids and sorts of garden chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.)

A.I. Nedoluzhko

Botanical Garden-Institute, Far East Branch RAS, Vladivostok, Russia

Many garden chrysanthemums bred across the world are not fully winter hardy. Many are damaged by fungal diseases due to a high humidity and are late flowering. This makes them unsuitable for general commercial marketing. Since 2000 we have been conducting a breeding program using natural species of the genus *Chrysanthemum* that are adapted to the local conditions. The strategy of breeding adaptive hybrids and varieties of chrysanthemum native to Russia was proposed based on their biological, genetic peculiarities and natural resources of *Chrysanthemum* with the use of interspecific hybridization. Research objects are the first generations of interspecific hybrids of F_1 obtained previously by the author as a result of the hybridization of varieties and wild species of *Chrysanthemum*. Derived from different species and varieties, F_1 hybrids were crossed among themselves to obtain the multicomponent F_2 progeny. F_2 seedlings with winter hardiness, resistance to *Puccinia horiana* Henn. and early flowering were used in closely related crosses. The offspring of F_3 from closely related crosses were also assessed and selected according to adaptive and decorative characteristics. Inclusion in the selection process of various sources of winter hardiness and resistance to *P. horiana* allowed positive characteristics to be increased in F_2 and to be revealed in F_3 . Adaptive signs of the wild species *Chrysanthemum naktongense* Nakai, *C. coreanum* (H. Lév. et Vaniot) Nakai, *C. zawadzkii* var. *tenuisectum* Kitag., *C. leiophyllum* Nakai, and *C. zawadzkii* subsp. *acutibolum* (DC.) Kitag., which have formed and fixed during evolution, were inherited and manifested in offspring of the multicomponent hybrids and the closely related crosses. Promising interspecific forms with biological signs determining the possibility of growing in extreme conditions of the subregion were selected.

Key words: *Chrysanthemum morifolium* Ramat.; wild species *Chrysanthemum*; interspecific hybridization; adaptive features; Russian Far East.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Недолужко А.И. Использование межвидовой гибридизации в селекции адаптивных гибридов и сортов хризантемы садовой (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(4):476–483. DOI 10.18699/VJ18.385

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Nedoluzhko A.I. Use of interspecific hybridization in the breeding of adaptive hybrids and sorts of garden chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.). Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(4):476–483. DOI 10.18699/VJ18.385 (in Russian)

Received 30.12.2017
Accepted for publication 28.03.2018
© AUTHOR, 2018

В мировом цветоводстве хризантема садовая (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) – одна из лидирующих культур в ландшафтном дизайне, топиарном искусстве, сезонной срезке. Однако интродуцированные в Россию сорта и полученное при межсортной гибридизации потомство характеризуются низким уровнем генетического разнообразия в отношении факторов, контролирующих устойчивость растений к действию биотических и абиотических стрессоров. Эффективный подход к расширению генетического разнообразия селекционных сортов основан на использовании ценных признаков диких родичей *Chrysanthemum*. В связи с поздним освоением дальневосточных ресурсов рода *Chrysanthemum* и удаленностью природного ареала от основных селекционных центров, природные виды *Chrysanthemum* до настоящего времени не востребованы российскими селекционерами для включения адаптивных признаков в геном культурных хризантем. В Государственном реестре селекционных достижений РФ пока отсутствуют районированные сорта хризантемы садовой, в генотип которых введены геномы или хромосомы диких видов *Chrysanthemum*.

Первые экспериментальные исследования и практические результаты по скрещиванию сортов и диких видов рода *Chrysanthemum* получены за рубежом. На генетической основе восточноазиатских многолетних видов *Chrysanthemum* еще в 30-х гг. прошлого столетия в США и Англии созданы уникальные по своим адаптивным и разнообразным декоративным характеристикам формы, имеющие промышленное значение (Kuykendall, Gale, 1949; Anderson, Gesick, 2003; Anderson, 2007; Anderson et al., 2008; Machin, 2012).

Успешную гибридизацию современных сортов хризантемы садовой (*C. morifolium* Ramat.) с индигенными субтропическими видами *C. shiwoigiku* Kitam., *C. pacificum* Nakai, *C. makino* Matsum. et Nakai, *C. nankingense* Hand.-Mazz., *C. indicum* L., *C. vestitum* (Hemsl.) Stapf, *C. chanetii* H. Lév., *C. zawadzkii* Herbach осуществляют в Японии, Китае с целью передачи генов, определяющих габитусальные особенности, устойчивость к белой ржавчине, листовому минеру, тле, абиотическим и техногенным факторам (Yamaguchi, 1981; Jong, Rademaker, 1989; Wang, Chen, 1990; Chen et al., 1995; Douzono, Ikeda, 1998; Suenaga et al., 1998; Cheng et al., 2010, 2011; Sun et al., 2010).

Прогресс в создании отечественных комплексно адаптивных сортов пока невелик. Выращиваемые в России хризантемы получены при свободном или межсортном опылении малозимостойких зарубежных садовых гибридов и сортов (Забелин, 1972; Козьменко, 2013; Тухваллина, Миронова, 2014) и требуют укрытия на зиму. Большинство их не обеспечено эффективными генами устойчивости к особо опасному карантинному патогену – белой ржавчине хризантем (*Puccinia horiana* Henn.): в период наблюдавшихся эпифитотий (2005, 2006, 2015, 2017 гг.) на коллекционных участках Ботанического сада-института выявлено только 34 % абсолютно устойчивых сортообразцов (Недолужко, 2008а). Происходящая из субтропических районов Восточной Азии, обладающая высокой фотопериодической чувствительностью и требующая для закладки генеративных органов короткого светового дня, хризантема садовая задерживается со сроками цвете-

ния в умеренных широтах России, где продолжительный световой день и короткий вегетационный период.

Перспективным направлением отечественной селекции хризантемы садовой является создание нового селекционного материала на основе использования природного генофонда рода *Chrysanthemum* с целью интрогрессии в культурные сорта ценных адаптивных признаков.

Первые работы в России по использованию межвидовой гибридизации в селекции хризантемы садовой начаты автором в начале текущего столетия. Предбридинговые исследования представителей восточноазиатских многолетних видов *Chrysanthemum* показали, что очень немногие маньчжурские *C. naktongense* Nakai, 1909, Bot. Mag. (Tokyo), 23: 186; *C. coreanum* (H. Lév. et Vaniot) Nakai, 1940, J. Jap. Bot. 16, 2: 74; и корейские высокогорные *C. zawadzkii* var. *tenuisectum* Kitag., 1942, Rep. Inst. Sci. Res. Manchoukuo, 6: 129; *C. leiophyllum* Nakai, 1921, Bot. Mag. (Tokyo), 35: 147; *C. zawadzkii* subsp. *acutibulum* (DC.) Kitag., 1939, Rep. Inst. Sci. Res. Manchoukuo, 3, 2: 444 (Lin. Fl. Manshur.) выступают надежными комплексными источниками и донорами адаптивных признаков (устойчивость к *P. horiana*, зимостойкость, ранний срок цветения).

Многообразие аллелей диких видов *Chrysanthemum* при введении их в гибридизацию предполагает повышение гетерозиготности и, следовательно, создание не только специфической, но и комплексной адаптивности. Введение генов ценных признаков одного или нескольких дикорастущих представителей *Chrysanthemum* в геномный состав культурного сорта позволит совершенствовать генетическую основу последнего. Автором синтезированы первые межвидовые гибриды F₁ на основе культивируемых сортов (Вродлива, Линда, Хамелеон, Стелуца) и восточноазиатских многолетних видов (*C. naktongense*, *C. coreanum*, *C. zawadzkii* var. *tenuisectum*, *C. leiophyllum*, *C. zawadzkii* subsp. *acutibulum*), которые совмещают в своем генотипе гены вида-донора, обеспечивающие устойчивость к болезням, выносливость к зимним экстремальным факторам, раннее цветение, легкую укореняемость, и качества высокодекоративного сорта-реципиента (Недолужко, 2010). Полученные сортовидовые гибриды F₁ показали возможность объединения геномов сортовых форм и природных видов *Chrysanthemum*, введения генетического материала на межгеномном уровне и явились новыми источниками адаптивных признаков. Дальнейшими скрещиваниями межвидовых гибридов F₁ с различным геномным составом и последующей близкородственной гибридизацией межгибридных форм F₂ мы рассчитываем объединить в новых организмах разнообразие доминантных генов устойчивости к *P. horiana*, отбраковать сеянцы с гомозиготным состоянием рецессивных аллелей восприимчивости к *P. horiana*, накопить рецессивные аллели генов, отвечающих за зимостойкость и другие адаптивные показатели (феноритмотип роста и развития, интенсивность возобновления), и тем самым получить эффективные источники и доноры для создания адаптивных сортов.

Цель работы – создать новый селекционный материал хризантемы садовой на основе межвидовой гибридизации с природными видами *Chrysanthemum*. В связи с этим поставлены следующие задачи: изучить возможность объе-

динения ценных признаков при скрещивании межвидовых гибридов F_1 между собой; провести близкородственные скрещивания полученных межгибридных форм F_2 для выявления ценных признаков; оценить и отобрать новые селекционные формы по комплексу адаптивных и декоративных показателей.

Материалы и методы

Исследования проводили в 2000–2017 гг. на территории Ботанического сада-института ДВО РАН, расположенного в прибрежной зоне юга Приморского края. Климат муссонный. Основные лимитирующие факторы: неустойчивость снежного покрова либо полное его отсутствие; сочетание низких зимних температур и интенсивной инсоляции при наличии сильных северных и северо-западных ветров, иссушающих почву и зимующие органы многолетних растений; теплое влажно-тропическое лето (в летний период выпадает до 85–90 % годового количества осадков), способствующее бурному развитию грибных патогенов (Бакланов, 2010).

Объектом изучения были первичные межвидовые гибриды F_1 , полученные автором путем искусственной гибридизации незимостойких сортов хризантемы садовой, различающихся восприимчивостью к *P. horiana* Henn., и комплексно адаптивных диких видов *Chrysanthemum*: Вродлива $\times$ *C. naktongense* Nakai; Вродлива $\times$ *C. coreanum* (H. Lév. et Vaniot) Nakai; Вродлива $\times$ *C. zawadzkii* var. *tenuisectum* Kitag.; Вродлива $\times$ *C. zawadzkii* subsp. *acutibulum* (DC.) Kitag.; Линда $\times$ *C. naktongense* Nakai; *C. naktongense* Nakai $\times$ Линда; Хамелеон $\times$ *C. zawadzkii* var. *tenuisectum* Kitag.; Хамелеон $\times$ *C. leiophyllum* Nakai.

Происходящие от разных видов и сортов гибриды F_1 скрещивали между собой для получения межгибридного потомства F_2 . Отбирали комплексно адаптивные мультикомпонентные формы F_2 , которые привлекали в близкородственные скрещивания (беккроссы, сибсы, полусибсы). Гибридизацию (с предварительной изоляцией соцветий) осуществляли свежесобранной пылью однократно в период раскрытия большинства трубчатых цветков. Побеги с опыленными соцветиями срезали и дозаривали в сосудах с водой в необогреваемой теплице. Кастрацию не проводили, учитывая самонесовместимость хризантемы (Недолужко и др., 2002). Контроль – изоляция соцветий без опыления. Ревизию и обмолот семян проводили через один-два месяца после гибридизации, посев семян заканчивали в конце февраля–начале марта в условиях теплицы. В открытый грунт сеянцы высаживали с апреля по май. Генетическую совместимость определяли по результатам завязывания семян, всхожести и жизнеспособности сеянцев. В качестве критериев адаптивности растений учитывали зимостойкость, устойчивость к *P. horiana*, феноритмотип развития.

Отбор зимостойких генотипов проводили среди гибридных популяций после первой зимовки по особенностям весеннего восстановления после повреждающих зимне-весенних факторов по 5-балльной 6-ступенчатой шкале, где балл 0 – полное вымерзание растений, балл 5 – подмерзание отсутствует. Мониторинг зимостойкости отобранных сеянцев выполняли еще в течение ряда лет на высоких грядах без искусственного укрытия.

Отбор на устойчивость к *P. horiana* и другим грибным фитопатогенам (*Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., *Botrytis cinerea* Pers., *Septoria chrysanthemi-indici* Bubák & Kabát) проводили на естественном инфекционном фоне в период эпифитотий *P. horiana* (2005, 2006, 2015, 2017 гг.) с дополнительным заражением спорами *P. horiana* путем стряхивания их с пораженных листьев сильновосприимчивых сортов. Поражение растений белой ржавчиной оценивали по 4-балльной 5-ступенчатой шкале, где балл 0 соответствует отсутствию проявления признака, балл 4 – максимальному его выражению. Согласно полученному баллу, образцам присваивали литеры, обозначающие степень поражения патогеном (Коновалов, 2002).

В период массового цветения среди комплексно адаптивных потомков отбирали высокодекоративные сеянцы (Методика..., 1968, 2007). Элементами в оценке и отборе на декоративность служили начало, продолжительность и обилие цветения, размер и окраска соцветий, признаки вегетативной сферы (неполегаемость, компактность, степень облиственности). К перспективным сеянцам относили комплексно адаптивные с зимостойкостью 4–5 баллов, без малейших симптомов поражения грибными патогенами, цветущие в оптимальные сроки (сентябрь–октябрь). В период 2000–2017 гг. выполнено 38 комбинаций скрещиваний, опылено 239 соцветий, получено 5318 гибридных семян, выращен 1751 сеянец, выделено 72 перспективных отбора.

Результаты и обсуждение

Совместимость гибридов F_1 при гибридизации.

Получение F_2

Нашими экспериментами выявлена возможность скрещиваний первичных сортовидовых гибридов F_1 , но их эффективность была неодинаковой. Наиболее результативными по завязываемости семян и выживаемости сеянцев оказались комбинации сложных скрещиваний № 40-12, 43-12, 45-12, 46-12 (см. таблицу), имеющие в своем составе сорта Линда, Хамелеон и виды *C. naktongense*, *C. zawadzkii* var. *tenuisectum*, *C. leiophyllum*. Практически отсутствовали характерные для отдаленной гибридизации затруднения, гибридные семена в большинстве случаев завязывались нормально, проростки вполне жизнеспособны, сеянцы хорошо развиваются. В отдельных межгибридных семьях совмещение чужеродных геномов в новом организме вызвало низкую завязываемость семян, слабую их выполненность, плохую всхожесть и разного рода нарушения роста и развития сеянцев (хлорофильная недостаточность, бифуркации, фасциации побегов).

Преобладающее число потомков F_2 развивалось по сценарию диких родителей (Недолужко, 2008б). По сравнению с потомством F_1 , отличавшимся фенотипическим единообразием в пределах семьи (Недолужко, 2010), все изученные межгибридные комбинации F_2 увеличили размах изменчивости сеянцев по морфологическим признакам (общий габитус, степень облиственности, размер и окраска соцветий, срок цветения, энергия порослеобразования), а также обнаружили непрерывный ряд изменчивости по адаптивным показателям. У большинства сеянцев F_2 наблюдалось сочетание признаков культурных

Results of interhybrid and closely related crosses of hardy garden chrysanthemum

Breeding number of the family	Parental couples		♂	Number of inflorescences pollinated	Seeds	Seedlings analyzed		
	♀					total number of seeds set	per inflorescence	sprouts, pcs/%
F ₂ = F ₁ × F ₁								
08-66	Linda × C. naktongense Nakai	Vrodliva × C. coreanum (H. Lév. et Vaniot) Nakai	5	45	9.0	34/75.6	34	1/2.9
40-12	Chameleon × C. zawadzkkii var. tenuisectum Kitag.	C. naktongense Nakai × Linda	9	621	69.0	265/42.7	241	8/3.3
43-12	Linda × C. naktongense Nakai	Chameleon × C. leiophyllum Nakai	4	217	54.2	127/58.5	119	0/0
44-12	Chameleon × C. zawadzkkii var. tenuisectum Kitag.	Linda × C. naktongense Nakai	4	49	12.2	12/24.5	8	0/0
45-12	C. naktongense Nakai × Linda	Chameleon × C. leiophyllum Nakai	4	281	70.2	185/65.8	155	1/0.6
46-12	C. naktongense Nakai × Linda	Chameleon × C. zawadzkkii var. tenuisectum Kitag.	5	376	75.2	172/45.7	162	0/0
47-12	Chameleon × C. leiophyllum Nakai	C. naktongense Nakai × Linda	5	62	12.4	3/4.8	3	0/0
69-12	Chameleon × C. leiophyllum Nakai	Chameleon × C. zawadzkkii var. tenuisectum Kitag.	6	62	10.3	2/3.2	2	0/0
33-15	Chameleon × C. zawadzkkii var. tenuisectum Kitag.	Vrodliva × C. zawadzkkii subsp. acutilobum (DC.) Kitag.	15	255	17.0	25/9.8	19	1/5.3
34-15	Vrodliva × C. zawadzkkii subsp. acutilobum (DC.) Kitag.	Chameleon × C. zawadzkkii var. tenuisectum Kitag.	7	53	7.6	16/30.2	16	1/6.3
37-15	Linda × C. naktongense Nakai	Chameleon × C. zawadzkkii var. tenuisectum Kitag.	7	55	7.9	22/40.0	13	2/15.4
42-15	Vrodliva × C. zawadzkkii subsp. acutilobum (DC.) Kitag.	Linda × C. naktongense Nakai	6	145	24.1	55/37.9	51	2/3.9
43-15	Linda × C. naktongense Nakai	Vrodliva × C. zawadzkkii subsp. acutilobum (DC.) Kitag.	6	77	12.8	7/9.1	7	1/14.3
F ₃ HS ₁ (half-sibs)								
51-14	40-12*	46-12	3	87	29.0	14/16.1	14	0/0
52-14	46-12	40-12	2	62	31.0	12/19.3	12	1/8.3
44-13	C. naktongense Nakai × Linda	Linda × C. naktongense Nakai	6	240	40.0	88/36.7	52	1/1.9
58-12	Linda × C. naktongense Nakai	C. naktongense Nakai × Linda	3	257	85.7	88/34.2	86	0/0
50-14	Vrodliva × C. naktongense Nakai	Vrodliva × C. coreanum (H. Lév. et Vaniot) Nakai	2	111	55.5	85/76.6	19	7/36.8
41-15	Vrodliva × C. zawadzkkii subsp. acutilobum (DC.) Kitag.	Vrodliva × C. coreanum (H. Lév. et Vaniot) Nakai	4	–	–	30/–	20	1/5.0
50-15	Linda × C. naktongense Nakai	Vrodliva × C. naktongense Nakai	4	15	3.8	6/40.0	6	1/16.7
52-15	Vrodliva × C. zawadzkkii subsp. acutilobum (DC.) Kitag.	Vrodliva × C. naktongense Nakai	4	–	–	45/–	42	1/2.4

End of the table

Breeding number of the family	Parental couples ♀	♂	Number of inflorescences pollinated	Seeds total number of seeds set	per inflorescence	sprouts, pcs/%	Seedlings analyzed total pcs of them promising, pcs/%
F ₃ Bc ₁ (backcrosses)							
19-14	40-12	Chameleon × C. <i>zawadzki</i> var. <i>tenuisectum</i> Kitag.	4	320	80.0	86/26.9	77 3/3.9
56-15	45-12	C. <i>naktongense</i> Nakai × Linda	2	76	38.0	4/5.2	4 1/25.0
25-14	58-12	Linda × C. <i>naktongense</i> Nakai	3	233	77.7	70/30.0	61 1/1.6
26-14	(Chameleon × C. <i>zawadzki</i> var. <i>tenuisectum</i> Kitag.) × Stelutsa	Chameleon × C. <i>zawadzki</i> var. <i>tenuisectum</i> Kitag.	3	93	31.0	12/12.9	12 0/0
80-15	Linda × C. <i>naktongense</i> Nakai	08-66	7	128	18.3	14/10.9	14 1/7.1
11-16	(46-12) × (40-12)	40-12	16	185	11.6	22/11.9	16 1/6.2
16-16	(46-12) × (40-12)	46-12	14	296	21.1	75/25.3	75 16/21.3
F ₃ S ₁ (sibs)							
72-15	45-12	45-12	13	61	4.7	12/19.7	6 1/16.7
77-15	08-66	08-66	11	95	8.6	21/22.1	15 1/6.7
76-15	08-66	08-66	11	95	8.6	21/22.1	19 0/0
42-14	40-12	40-12	6	124	20.7	6/4.8	6 0/0
40-14	(Chameleon × C. <i>zawadzki</i> var. <i>tenuisectum</i> Kitag.) × Stelutsa	(Chameleon × C. <i>zawadzki</i> var. <i>tenuisectum</i> Kitag.) × Stelutsa	2	50	25.0	27/54.0	23 0/0
18-16	19-14	19-14	6	3	0.5	1/33.3	1 0/0
17-16	46-12	46-12	8	5	0.6	2/66.7	1 1/100
15-16	52-14	52-14	12	86	7.2	11/12.8	4 1/25.0
Other related							
40-16	Chameleon × C. <i>zawadzki</i> var. <i>tenuisectum</i> Kitag.	Vrodliya × (Vrodliya × C. <i>zawadzki</i> var. <i>tenuisectum</i> Kitag.)	4	204	51.0	50/24.5	45 15/33.3
46-16	(Linda × C. <i>naktongense</i> Nakai) × Linda	Linda × C. <i>naktongense</i> Nakai	6	194	32.3	24/12.4	11 1/9.1

* Here and below designations follow the first column.

сорт (прочность цветоносов, крупные соцветия, яркая окраска, длительность и обилие цветения) и диких видов *Chrysanthemum* (сильная облиственность генеративных побегов, интенсивное образование побегов возобновления, выносливость к природным стрессам). Отобраны гармонично развитые мультикомпонентные формы F_2 , указывающие на совместимость разных сортовых и видовых геномов в новом организме.

Зимостойкость гибридного потомства F_2

Культивируемые в России сорта хризантемы садовой, ведущие свое начало от субтропических видов *Chrysanthemum*, не имеют ясно выраженного периода глубокого покоя (побеги возобновления продолжают рост осенью при низких положительных температурах $+1 \dots +6^\circ\text{C}$) и, не обладая запасом зимостойкости, погибают в течение зимы. Виды *Chrysanthemum* умеренного климата, завершая рост побегов в сентябре–октябре, в ходе осеннего закаливания формируют определенный уровень зимостойкости и вступают в состояние органического покоя, сохраняя его на протяжении всего зимнего периода. Полученные на генетической основе диких видов гибриды F_1 отличаются повышенной устойчивостью к климатическим факторам, превосходят своих теплолюбивых сортовых родителей по зимостойкости (Недолужко, 2010).

Использование повторного рекомбинационного процесса – скрещивание гибридов F_1 между собой – позволило увеличить в поколении F_2 число выносливых семян и усилить выраженность признака зимостойкости. Среди межгибридного потомства F_2 выявлены формы, обладающие более длительным периодом глубокого зимнего покоя и замедленным темпом весеннего отрастания. Последовательно накапливая гены разных видов *Chrysanthemum*, нам удалось повысить биологический запас зимостойкости в межгибридных формах, обеспечить их адаптивность в экстремальных условиях. Наибольшее число зимостойких генотипов (до 54.5 %) отобрано в мультикомпонентных семьях на основе видов *C. naktongense*, *C. zawadzkyi* var. *tenuisectum*, *C. leiophyllum*. Наблюдения за ними в течение последующих трех–четырех лет подтвердили высокую выносливость в суровом климате. Таким образом, введение в гибридизацию разных видов *Chrysanthemum* привело к накоплению полигенов зимостойкости хотя бы в единичных семенах F_2 либо способствовало другим сочетаниям в новых комбинациях, что позволило усилить имеющиеся положительные тенденции (положительные трансгрессии) или выявить нежелательные признаки и свойства.

Созданные на сложной генетической основе межгибридные формы F_2 служат новыми источниками зимостойкости для дальнейшей селекции на еще более высокий уровень устойчивости к низким температурам, а родительские межвидовые гибриды F_1 могут быть использованы в качестве доноров этого признака.

Устойчивость гибридного потомства F_2 к *P. horiana* Henn.

Доминирование признака устойчивости к белой ржавчине хризантем (Jong, Rademaker, 1986; Недолужко А.И., Недолужко А.В., 2010) и сравнительно простая его генетическая детерминация облегчают отбор в первом и последующих поколениях гибридов и возможность передачи эффектив-

ных генов диких видов *Chrysanthemum* в процессе селекционной работы. Анализ межгибридных популяций F_2 на устойчивость к *P. horiana* выявил наличие от 2.9 до 17.3 % (в зависимости от комбинации скрещивания) восприимчивых к белой ржавчине растений, что может свидетельствовать о достижении гомозиготности по рецессивным генам, определяющим восприимчивость к патогену, и гетерозиготности признака устойчивости у родительских форм F_1 , и/или перекомбинации факторов устойчивости.

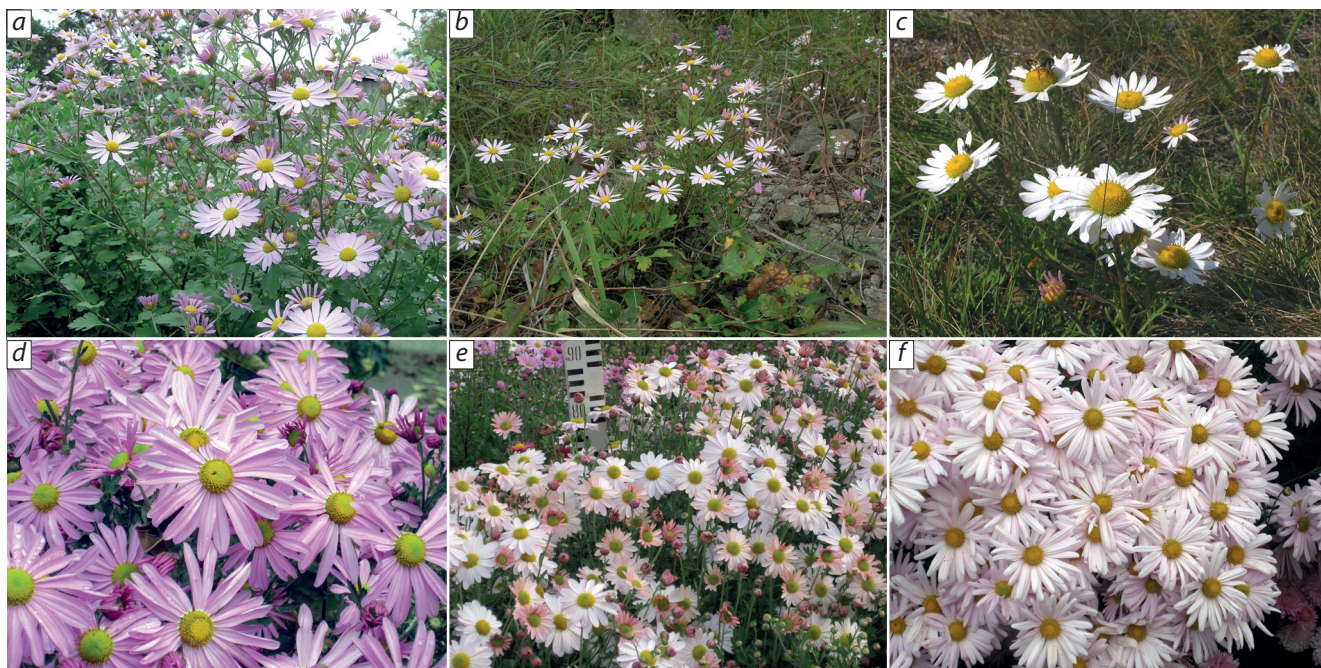
Феноритм тип роста и развития

Тип роста и скорость развития – важные факторы, влияющие на адаптивность растений, однако генетический контроль типа и скорости развития у хризантемы пока не изучен. Яровой тип развития (моноцикличность побегов), присущий субтропическим видам *Chrysanthemum* и созданным на их основе сортам хризантемы садовой (Недолужко, 2008б), возможно, связан с отсутствием генов зимостойкости, и наоборот, озимый тип развития (двацикличность побегов) видов умеренного климата определяется их наличием. В гибридном поколении F_2 наблюдается изменчивость потомства по типу развития и сроку цветения. Преобладающее число (72.3–87.8 %) семян развиваются по сценарию диких родителей (озимый тип): в первый год образуют приземную розетку листьев и уходят в зиму в фазе вегетативного клона. В генеративное состояние вступают на второй год роста (Недолужко, 2008б). Процессы подготовки растений к зиме начинаются задолго до окончания периода вегетации и зависят от температуры и длины дня, а фотопериодическая реакция тесно связана с их зимостойкостью. Зимостойкие виды *Chrysanthemum* умеренного климата раньше реагируют замедлением роста на сокращение длины дня осенью, в отличие от незимостойких субтропических представителей, продолжающих вегетировать до самых морозов, и передают свои качества гибриднему потомству.

По сроку вступления в генеративное состояние и фенодате «начало цветения» потомки F_2 представляют непрерывный ряд изменчивости от рано- до позднецветущих (с различной длительностью периода от начала вегетации до начала цветения). Отмечены семена с неполным циклом развития (не успевшие достигнуть фазы цветения в связи с наступлением морозов, т.е. развивались как полужаровые–полуозимые). По особенностям расщепления можно предполагать высокую полигенность признака «начало цветения», что обеспечивает широкие возможности для отбора и сохранения нужного свойства в гибридах.

Были отобраны образцы, цветущие в оптимальные сроки на данной широте ($43^\circ 13' 27.48''$ с. ш., $131^\circ 59' 36.32''$ в. д.). Сравнение результатов наследования типа развития и фенологического ритма гибридов F_1 (Недолужко, 2010) и межгибридных форм F_2 (наст. исследование) предполагает некоторые тенденции эволюционного формирования признака как количественного, происходящего путем постепенного и длительного накопления отдельных изменений.

Скрещивание межвидовых гибридов F_1 показывает, что они хорошо передают свои ценные качества отдельным потомкам F_2 . Это позволяет считать их комплексными донорами таких признаков, как зимостойкость, устойчивость к *P. horiana*, ранний срок цветения, интенсивное



Chrysanthemum species and hybrids: a, *C. leiophyllum*; b, *C. nakdongensis*; c, *C. coreanum*; d, F_2 ; e, F_1 ; f, F_3S_1 .

вегетативное возобновление. Выделенные в F_1 и F_2 поколениях источники и доноры ценных признаков послужили основными компонентами в схемах близкородственных скрещиваний.

Беккроссы, сибсы, полусибсы

Близкородственные скрещивания сложных межвидовых гибридов F_2 выявили в потомстве F_3 иммунные к *P. horiana* и выносливые к экстремальным факторам среды формы, что может свидетельствовать об успешной интрогрессии эффективных генов диких видов *Chrysanthemum* в полученный селекционный материал (см. таблицу). Отобраны комплексно адаптивные и декоративные сеянцы. Выявлены рекомбинантные формы с признаками сдержанного роста, продолжительным цветением.

Декоративность

Декоративность – важный интегральный показатель новых гибридов, который во многом зависит от их адаптации к комплексу неблагоприятных биотических и абиотических факторов, срока цветения, общей архитектоники растений, назначения использования. Среди комплексно адаптивных сеянцев F_2 и F_3 в качестве перспективных отобраны 72 высокодекоративные формы (см. рисунок), которые вегетативно размножены и находятся на разной стадии изучения (первичное, конкурсное сортоизучение). Мониторинг в течение трех-пяти лет выделенных в элиту и размноженных вегетативно отборов подтвердил стабильность проявления адаптивных показателей и позволил присвоить им статус сорта. Новые сорта Денница, Восточная Славянка, Звездная Россыпь, Лазурный Берег, Морская Пена, Северная Пацифика, Созвездие проходят государственное сортоиспытание.

По частоте возникновения в гибридных потомствах положительных трансгрессий – генотипов с комплексом

полезных признаков, совмещающих в одном организме устойчивость, зимостойкость, оптимальный срок цветения, определена селекционная ценность используемых родительских форм. Такими формами можно считать межвидовые F_1 гибриды: Вродлива $\times$ *C. coreanum* (H. Lév. et Vaniot) Nakai; Вродлива $\times$ *C. zawadzskii* subsp. *acutilobum* (DC.) Kitag.; Линда $\times$ *C. nakdongense* Nakai; *C. nakdongense* Nakai $\times$ Линда; Хамелеон $\times$ *C. zawadzskii* var. *tenuisectum* Kitag.; Хамелеон $\times$ *C. leiophyllum* Nakai.

Таким образом, межвидовая гибридизация хризантемы садовой позволила расширить спектр изменчивости, обогатить селекционный генофонд новыми полезными признаками и свойствами (совместить и повысить требуемый уровень зимостойкости с устойчивостью к *P. horiana*). Созданные более совершенные формы хризантемы садовой на новой генетической основе, проверенные в условиях всевозможных природных катаклизмов российского Дальнего Востока, уже сейчас являются ценнейшим исходным материалом для получения зимостойких, иммунных, высокодекоративных сортов и для других регионов России.

Заключение

Определена успешность скрещивания первичных межвидовых гибридов F_1 с разной генетической основой. Совмещение аллелей разных видов и сортов *Chrysanthemum* способствовало созданию мультикомпонентных гибридных форм F_2 с комплексом важных признаков и свойств, появлению положительных трансгрессий, дающих возможность перейти на более высокий уровень адаптивных признаков и рассчитывать на новые трансгрессии. Путем близкородственных скрещиваний межгибридных форм F_2 удалось существенно повысить частоту выпячивания трансгрессивных генотипов.

Предложенная стратегия заключается в накоплении адаптивных полигенов в сложных межвидовых комплек-

сах с последующим выявлением их при близкородственных скрещиваниях.

Проведенные исследования позволили выйти на качественно новый уровень создания отечественных гибридов и сортов хризантемы садовой, совмещающих иммунитет к *P. horiana* Henn., устойчивость к экстремальным зимним факторам, оптимальные сроки цветения, интенсивность вегетативного возобновления и высокую декоративность. Это способствует расширению адаптивного сортамента для активно формирующегося отечественного цветочного рынка.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 09-04-98526-r_vostok_a of 2009–2010 and the Far East Branch of the Russian Academy of Sciences, project 14-III-D-06-039 of 2014. The author thanks reviewers for valuable remarks.

Conflict of interest

The author declares no conflict of interest.

References

- Anderson N.O. Chrysanthemum. *Dendranthema* × *grandiflora* Tzvel. In: Flower Breeding and Genetics: Issues, Challenges, and Opportunities for the 21st Century. Dordrecht: Springer, 2007;389-437.
- Anderson N., Ascher P., Gesick E. Winter-hardy Mammoth™ series garden chrysanthemums 'Red Daisy', 'White Daisy', and 'Coral Daisy' sporting a shrub plant habit. Hort. Science. 2008;43(3):648-654.
- Anderson N.O., Gesick E. Container production of prostrate garden chrysanthemums. Hort. Science. 2003;38(7):1344-1348.
- Baklanov P.Ia. (Ed.). Coastal-Marine Management: Theory, Indicators, Regional Differences. Vladivostok, 2010. (in Russian)
- Chen J.Y., Wang S., Wang X., Wang P. Thirty years' studies on breeding ground-cover chrysanthemum new cultivars. Acta Hort. 1995;404:30-36.
- Cheng X., Chen S., Chen F., Deng Y., Fang W., Tang F., Liu Z., Shao W. Creating novel chrysanthemum germplasm via interspecific hybridization and backcrossing. Euphytica. 2011;177:45-53.
- Cheng X., Chen S., Chen F., Fang W., Deng Y., She L. Interspecific hybrids between *Dendranthema morifolium* (Ramat.) Kitam. and *D. nankingense* (Nakai) Tzvel. achieved using ovary rescue and their cold tolerance characteristics. Euphytica. 2010;172:101-108.
- Douzono M., Ikeda H. All year round productivity of F₁ and BC₁ progenies between *Dendranthema grandiflorum* and *D. shiwogiku*. Acta Hort. 1998;452:303-310.
- Jong J. de., Rademaker W. The reaction of Chrysanthemum cultivars to *Puccinia horiana* and the inheritance of resistance. Euphytica. 1986;35:945-952.
- Jong J. de, Rademaker W. Interspecific hybrids between two *Chrysanthemum* species. Hort. Science. 1989;24(2):370-372.
- Kononov Y.B. Plant Breeding for Resistance to Diseases and Pests. Moscow, 2002. (in Russian)
- Koz'menko N.P. Results of studies on the introduction and breeding of small-flowered chrysanthemums in the subtropical zone of Russia. Subtropicheskoe i Dekorativnoe Sadovodstvo = Subtropical and Ornamental Horticulture. 2013;49:170-178. (in Russian)
- Kuykendall J.R., Galey D.O. The role of the Korean hybrids in the development of the new hardy garden chrysanthemums. Missouri Bot. Gard. Bull. 1949;37(8):161-178.
- Machin B. The origins of hardy border chrysanthemums. Plantsman. 2012;3:20-23.
- Methodology of state trials of crop varieties. Moscow, 1968. Vol. 6. Ornamental Plants. (in Russian)
- Methods of tests for distinctness, uniformity and stability: Chrysanthemum. The Official Newsletter of the State Commission of the Russian Federation for Testing and Protection of Breeding Achievements. 2007;10:976-1002. (in Russian)
- Nedoluzhko A.I. Evaluation of varieties, species, and hybrids of hardy garden mums for resistance to white rust. Vestnik RASKhN = Herald of the Russian Academy of Agricultural Sciences. 2008a;2:56-58. (in Russian)
- Nedoluzhko A.I. Ontogenetic features of *Chrysanthemum* (Asteraceae) species under cultivation in the southern Primorye. Rastitelnye Resursy = Plant Resources. 2008b;44(4):1-11. (in Russian)
- Nedoluzhko A.I. Prospects for the use of wild relatives in the adaptive selection of hardy garden mum. Sibirskiy Vestnik Selskokhozyaystvennoy Nauki = Siberian Herald of Agricultural Sciences. 2010;11:43-50. (in Russian)
- Nedoluzhko A.I., Dudkin R.V., Fadeev K.E. Flowering and pollination of *Dendranthema* species by cultivation. Proceedings of the International Conference "Role of botanical gardens in biodiversity preservation". Rostov-on-Don, 2002;217-218 (in Russian)
- Nedoluzhko A.I., Nedoluzhko A.V. The inheritance of resistance to white rust in hybrid progeny of hardy garden mum. Sibirskiy Vestnik Selskokhozyaystvennoy Nauki = Siberian Herald of Agricultural Sciences. 2010;6:50-56. (in Russian)
- Suenaga H., Ikeda H., Hamamura T., Douzono M., Onozaki T. Evaluation of *Dendranthema* and related species in Japan for resistance to *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae). Abst. EUCARPIA 19th Int. Symp., Improvement of Ornamental Plants. France, 1998;23.
- Sun C.Q., Chen F.D., Teng N.J., Liu Z.L., Fang W.M., Hou X.L. Interspecific hybrids between *Chrysanthemum grandiflorum* (Ramat.) Kitam. and *C. indicum* (L.) Des Moul. and their drought tolerance evaluation. Euphytica. 2010;174:51-60. DOI 10.1007/s10681-009-0005-6.
- Tukhvatullina L.A., Mironova L.N. Introduction and Breeding of Korean Chrysanthemum in Bashkortostan. Ufa, 2014. (in Russian)
- Wang P., Chen J. Studies on breeding ground-cover chrysanthemum new cultivars. Acta Hort. Sinica. 1990;17(3):223-228.
- Yamaguchi T. Chrysanthemum breeding for resistance to white rust. Japan. J. Breed. 1981;31:121-132.
- Zabelin I.A. Breeding new varieties of chrysanthemums. Trudy Nikitskogo Botanicheskogo Sada = Works of the State Nikita Botanical Gardens. 1972;2(59):11-19. (in Russian)

Monitoring of *Aegilops* L. local species genetic diversity of Kazakhstan's flora

R. Urazaliev¹, M. Yessimbekova¹✉, K. Mukin¹, A. Chirkin², G. Ismagulova²

¹ Kazakh Scientific Research Institute of Agriculture and Plant Growing, Almaty, Kazakhstan

² M.A. Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry, Almaty, Kazakhstan

Cereal Crop Wild Relatives (CWR) are a very important gene pool for cereal/wheat improvement. New genes for resistance to diseases and pests are urgently needed to avoid using pesticides and to raise adaptivity to the environmental stresses caused by global climate change. In this regard, the study is aimed at *ex situ* conservation of *Aegilops* L. genus local ecotypes' genetic diversity, which is very relevant and promising for breeding. In order to establish breeding utility and form an *ex situ* collection reflecting the intra- and inter-specific diversity, the phenotypic screening of Kazakhstan's local populations of *Aegilops* L. genus (*Ae. cylindrica*, *Ae. tauschii*, *Ae. triuncialis* and *Ae. crassa*) was conducted on the basis of multiple indicators. For the first time molecular-genetic analysis of 50 representatives of *Aegilops* L. genus from Kazakhstan's flora was performed. The microsatellite analysis with the use of 11 EST-SSR markers revealed eight of them to be most effective. For each marker, allele frequency and average heterozygosity was calculated. For the most informative markers the presence of 5 and 6 respective allelic variations was found. A bank of genomic DNA was created and kept in *ex situ* storage (–70 °C, long-term) in the IMBB of the MES of RK.

Key words: *Aegilops* L.; local population; phenotyping; molecular genetic analysis.

Мониторинг генетического разнообразия местных популяций рода *Aegilops* L. флоры Казахстана

Р. Уразалиев¹, М. Есимбекова¹✉, К. Мукин¹, А. Чиркин², Г. Исмагулова²

¹ Казахский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства, Алматы, Казахстан

² Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина, Алматы, Казахстан

Дикие сородичи – это таксоны диких растений, относящиеся к культурам, которые потенциально могут использоваться в качестве доноров генов многих полезных признаков, улучшая урожайность и/или качество, помогая избежать применения пестицидов и повышая адаптивность растений к экологическим стрессам в условиях глобального изменения климата. В этой связи актуальны исследования, направленные на сохранение и изучение генетического разнообразия местных экотипов рода *Aegilops* L. Проведен скрининг казахстанских местных популяций рода *Aegilops* L. (*Ae. cylindrica*, *Ae. tauschii*, *Ae. triuncialis*, *Ae. crassa*) для формирования коллекции *ex situ*, отражающей меж- и внутривидовое разнообразие. Мониторинг проведен на основе нескольких индикаторов для установления селекционной полезности (фенология, продуктивность, устойчивость к стрессам абиотического и биотического характера). Идентифицированы источники устойчивости к болезням, раннеспелости. Впервые выполнен молекулярно-генетический анализ 50 представителей рода *Aegilops* L. казахстанской флоры. Микросателлитный анализ выявил наиболее информативные EST-SSR маркеры (пять и шесть аллельных вариантов), была рассчитана частота аллелей и средняя гетерозиготность. Создан банк геномной ДНК для хранения *ex situ* (–70 °C).

Ключевые слова: *Aegilops* L.; местные популяции; фенотипирование; молекулярно-генетический анализ.

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Urazaliev R., Yessimbekova M., Mukin K., Chirkin A., Ismagulova G. Monitoring of *Aegilops* L. local species genetic diversity of Kazakhstan's flora. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(4):484–490. DOI 10.18699/VJ18.386

Received 12.12.2017

Accepted for publication 28.04.2018

© AUTHORS, 2018

Crop Wild Relatives (CWR) are wild plant taxa related to crops that have a potential use as gene donors as they possess many beneficial traits conferring pest and/or disease resistance, improve yield or quality. These traits can be bred into cereal crops to meet changing environmental or market demands. CWR have greater intrinsic genetic diversity due to their wide adaptation to a variety of habitats (Maxted, Kell, 2009; Maxted et al., 2012, 2013). Wild species are unique genetic resources especially for corresponding cultivated species, but in general sense, even distantly related species can serve as good gene donors of target characteristics. Many populations and localized sub-specific taxa of CWR are severely endangered by human activities such as overgrazing, especially in arid regions and by industrial and construction activities. It must be a responsibility of each country to take measures for their sustainable conservation (Holubec, 2005, 2010a, b). CWR represent a very important gene pool for cereal improvement. New genes for resistance to diseases and pests are urgently needed to avoid using pesticides and to raise adaptivity to environmental stresses in connection with global climate change. *Aegilops* L. genus is closely related to the cultivated wheat (donor of B and D genomes) and has an important potential for improving wheat resistance to various biotic and abiotic stresses. Many regions in Kazakhstan, rich in CWR, are severely endangered by human activities. Local ecotypes of *Aegilops* L. genus are often used in Kazakhstan as a grazing culture that may lead to in their complete destruction (Sitpaeva et al., 2004; Yessimbekova et al., 2004, 2017; Urazaliev et al., 2007; Alimgazinova, Yessimbekova, 2013). Long-term expeditions helped to collect more than

200 local ecotypes of *Aegilops* L. genus species. The lack of knowledge about the phenotypic and genetic diversity of the collected germplasm was a serious obstacle for its rational use in bread wheat programs and preservation *ex situ*. More comprehensive knowledge is required to identify the potential sources of their useful traits.

The present study investigates the diversity of four local species – *Ae. cylindrica*, *Ae. tauschii*, *Ae. triuncialis* and *Ae. crassa*. The results reveal the variation of agronomic traits, resistance to abiotic and biotic stresses, and genetic diversity of the collected germplasm. This data will be useful in future cultivation and breeding of domesticated wheat, especially where the goal is to increase adaptability of wheat in diverse environmental conditions. The goals of the study included: (1) phenotypic screening of agronomic traits diversity; (2) assessment for resistance to rust (yellow, brown, stem) on the artificial background; and (3) creation of genomic DNA bank for long term *ex situ* storage.

Materials and methods

Four provinces in North Kazakhstan, two provinces in West Kazakhstan, two provinces in South Kazakhstan, and South-Eastern Kazakhstan were surveyed for collecting the accessions. During the expeditions, a collection of more than 200 accessions of *Aegilops* L. was formed. The present study involves 50 accessions (local ecotypes) of four species *Ae. cylindrica*, *Ae. tauschii*, *Ae. triuncialis* and *Ae. crassa* from South and South-Eastern Kazakhstan. The geographical distribution of these four *Aegilops* L. species is shown in Fig. 1 (GPS data, MAPSOURCE program, USA).

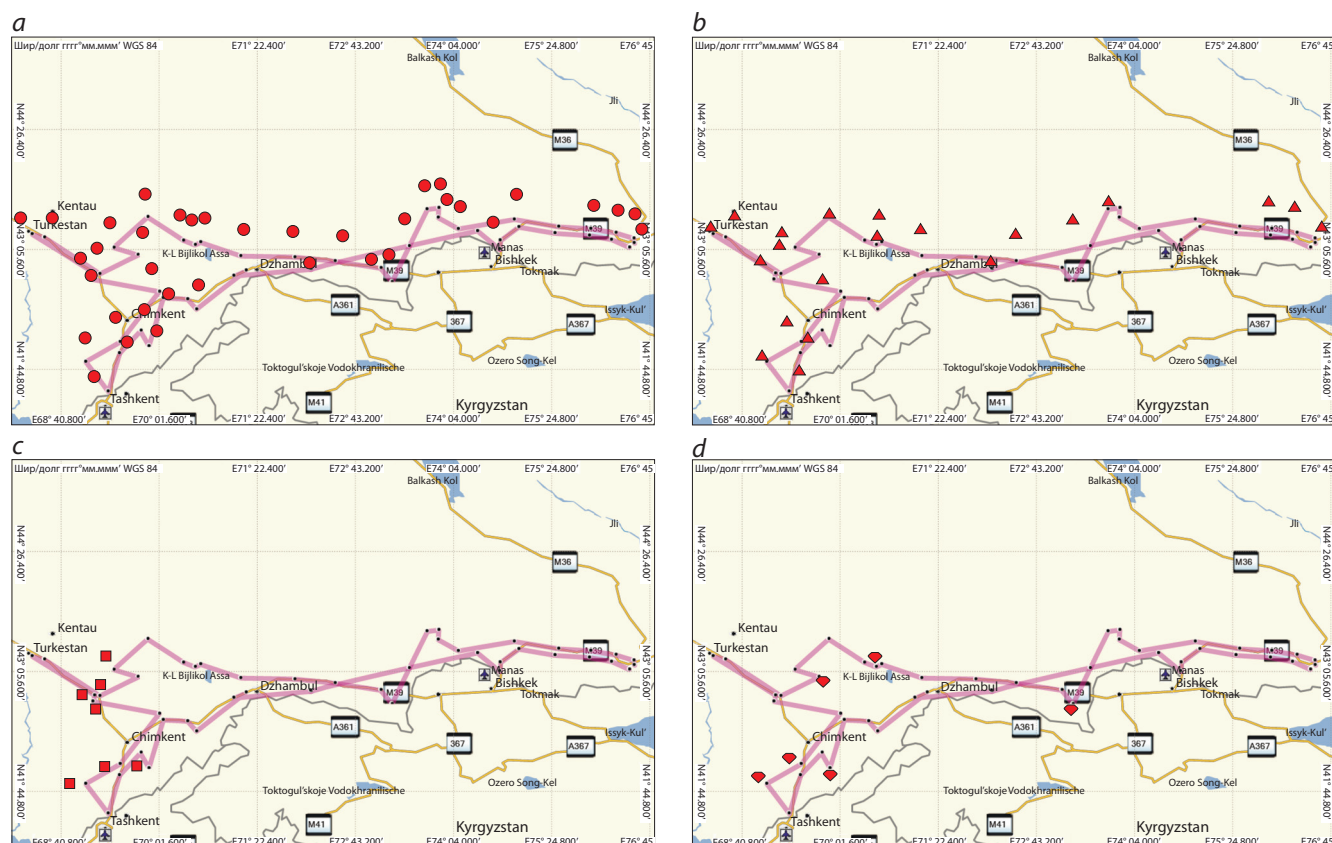


Fig. 1. Maps of four local *Aegilops* L. species distribution: a – *Ae. cylindrica*; b – *Ae. tauschii*; c – *Ae. crassa*; d – *Ae. triuncialis*.

Table 1. Sequences of EST-STS markers

Marker	Sequence (5'→3')	Annealing temperature, °C
PK1	F – GCCTTCGCCACCACTTC R – CACGACGTACAAGTACACATGC	53
PK3	F – TTGCTGAGGTGGTGTTCCT R – TAAGGGCTCCTCAAGCTCCT	51
PK5	F – GAGGCGGCCTACAAGAAGAT R – GAGGCGGCCTACAAGAAGAT	51
PK8	F – GCTAGCAACCAGAGACTCAC R – GTCGTCCTCGCTGTTGTTG	50
PK9	F – GTCCAGCTCTCGGTA CTGG R – TGCATCCAAACAAGCCATGC	49
PK29	F – TACTAGAGGAGATGCAGACG R – TGGCAATAGCCTGAACCACT	52
PK18	F – AGACGGCGCGCATGGCGA R – AAGTCTACGCGGTGAGGT	49
PK31	F – GATGGCTCCCGTAAAGATCA R – TTTCCATTTTCGAAAGCAC	50
PK32	F – GCGAGGCTCAACCAAGAG R – GCAAGGCTGGCTGAATCTAC	52
PK34	F – CGCAAATCGCAACCTTATTT R – CCTTGGAGATCCACAGATCC	50
PK57	F – AATTGGA AAAAGGTGGTGACG R – GTA ACTACCCTGGGGAAAA	50

Two species: *Ae. cylindrica*, *Ae. tauschii* were collected from 3 provinces of Kazakhstan – Almaty, Zhambyl, South-Kazakhstan, *Ae. triuncialis*, *Ae. crassa* were mainly collected from South-Kazakhstan province at various altitudes: *Ae. cylindrica* – 198–2200 m above sea level, *Ae. tauschii* and *Ae. triuncialis* – 223–934 m, *Ae. crassa* – 214–710 m. All plant accessions were maintained by the Department of Field Crop Genefund, Kazakh Scientific Research Institute of Agriculture and Plant Growing. The specimens representing each accession were grown in the experimental field (the foothill zone of the Zailiysky Alatau – 48° N, 77° E, 740 m above sea level) with the number of days with temperatures below 0 °C ranged from 125 to 130 and the average perennial precipitation of 360–400 mm. The soil cover of the experimental plot was light chestnut soils.

For phenotyping the protocols and technical guidelines of management in the field were used (Prescott et al., 2002; Engels, Visser, 2003; Reed et al., 2004). Such parameters as height of plants, spike length, number of spikelets, number of kernels and spike density were determined on randomly selected spikes from healthy mature plant specimens of each accession. The height of plants was measured from the ground to the top of the terminal spikelets on the spike (excluding awns), the spike length – from the base of the lowermost spikelet to the top of a spike excluding awns. The spike density was calculated from the number of spikelets divided by the spike length. Data on heading time were recorded according to the international methodology (from 01.01.), when approximately

50 % of the plants in a plot showed spikes. Winter hardness was calculated as the percentage of plants having survived in the spring after the last date of a possible winter kill report. Evaluation of the collections for leaf rust resistance was carried out using the modified Cobb scale (Peterson et al., 1948), where R marked resistance, MR – moderate resistance, MS – moderate susceptibility, S – susceptibility.

The genomic DNA from five- or seven-day seedlings was isolated according to the protocol of Thermo Scientific (EU) DNA isolation kit. The purity of the preparations was checked by electrophoretic separation in 1 % agarose gel and by spectrophotometry. A genomic DNA bank was put for *ex situ* storage (–70 °C, long-term). For molecular genetic analysis microsatellite markers (SSR) that had previously provided good results in the phylogeny of the genera *Triticum* and *Aegilops* were used (Bandopadhyay et al., 2004). PCR with STS primers was performed in a mixture containing 1 unit of HotTaq polymerase (Sileks), 4 pmol of forward and reverse primers, 200 µM each of dNTP and 100 ng of DNA. The PCR conditions were as follows: 95 °C – 5 min, 94 °C – 1 min, 49–53 °C (depending on the primer sequence, see Table 1) – 1 min, 72 °C – 1 min, repeated for 35 cycles, the last elongation – 5 min at 72 °C. Primers of the given sequence were synthesized in the ASM 800 machine (Biosset, Russia) using the phosphoimide method according to the Manufacturer's Instruction (Manual of oligonucleotides synthesizer ASN800. Novosibirsk, Russia, "Biosset", 2002). Sequences of the primers used in the study are presented in Table 1.

The amplification reaction products were fractioned in 10 % polyacrylamide gel (PAGE). Electrophoresis was performed at the voltage of 10 V/cm in 1×TBE buffer (50 mM Tris-H₃BO₃, 2 mM EDTA, pH 8.0).

Results

Winter hardness is the main adaptive feature of winter crops highly correlating with productivity (Grabovets, Fomenko, 2015; Gorash et al., 2017). Depending on the species and the site of collection, germination in autumn sowing ranged from 32 % (*Ae. tauschii*) to 73 % (*Ae. triuncialis*), the winter hardness varied from 10 to 100 %, see Fig. 2. High winter hardness (up to 100 %) marked 45.5 % of *Ae. triuncialis* accessions and 38.5 % of *Ae. tauschii* accessions. 14 accessions with high level (80–100 %) of winter hardness were selected: 2 accessions of *Ae. cylindrica* (T. Ryskulov, Sairam districts); 5 accessions of *Ae. tauschii* (T. Ryskulov, Saryagash, Arys, Otrar districts, Taldykorgan); 5 accessions of *Ae. triuncialis* (T. Ryskulov, Sairam, Bayzak, Talas, Jualinsky districts); 2 accessions of *Ae. crassa* (Ordabasinsky, Shardara districts).

Boxplots for six agronomical traits of *Ae. cylindrica*, *Ae. tauschii*, *Ae. triuncialis* and *Ae. crassa* are shown in Fig. 3 and 4. In each boxplot, the lower and upper boundaries of the box indicate 25 and 75 percentiles, the line within the box indicates the median, the lower and upper whiskers – the minimum and maximum within 1.5 times range of the box, the circles – the data points outside 1.5 times range of the box.

Vegetation period is one of the plants' basic biological properties that determine their suitability for environmental conditions. The vegetation period, in particular, the speed of development up to heading is associated with many properties that determine the reaction of plants to frost and drought, rust,

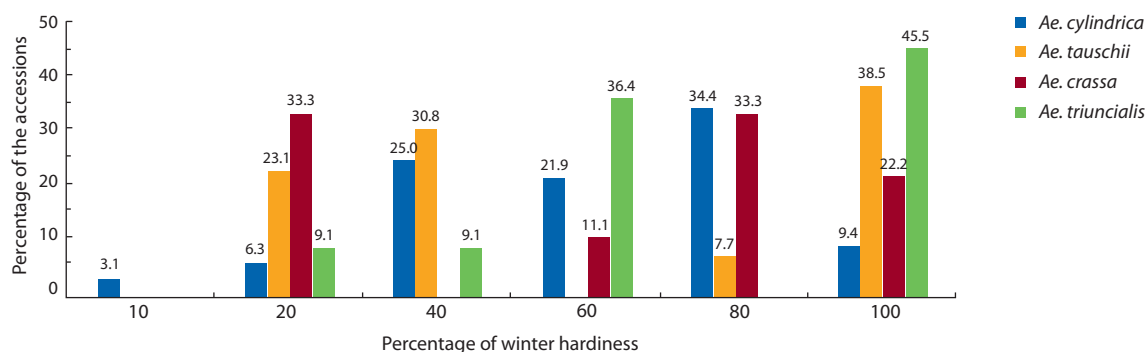


Fig. 2. The range of winter hardness variability of Kazakhstan *Aegilops* L. species.

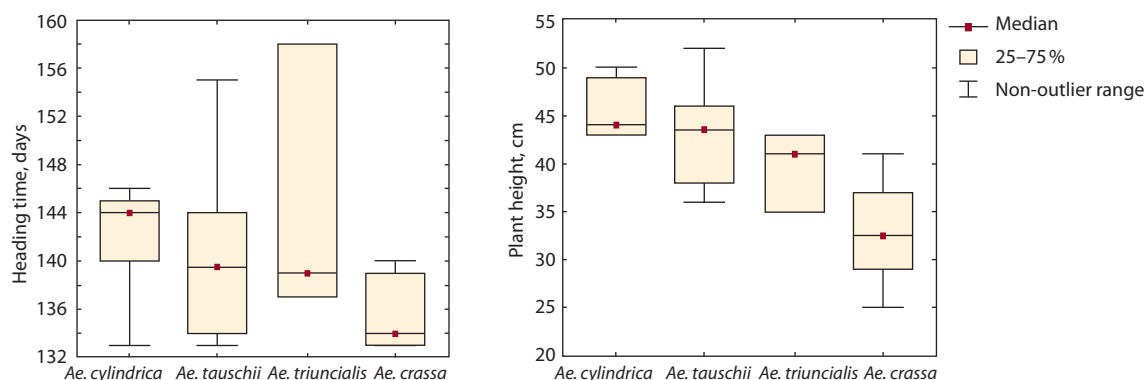


Fig. 3. Boxplots for 2 agronomical traits (heading time and plant height) in *Ae. cylindrica*, *Ae. tauschii*, *Ae. triuncialis* and *Ae. crassa*.

insect damage, productivity and grain quality (Kamran et al., 2014; Likhenko et al., 2014; Chen et al., 2016).

Depending on the species and the site of collection, significant intra- and inter-specific differences were observed in heading time. The range of variability between the variants is marked as 7 days (133–140) for *Ae. crassa*; 13 days (133–146) for *Ae. cylindrica*; 21 days (137–158) for *Ae. triuncialis*; 22 days (133–155) for *Ae. tauschii* (see Fig. 3). There were selected early headed (133–135 days) 8 accessions from *Ae. cylindrica*, *Ae. crassa* from Zhambyl, South Kazakhstan and *Ae. tauschii* from the Almaty province. Early headed accessions of *Ae. tauschii* from the Sarkand and Taldykorgan districts of the Almaty province were clearly separated from *Ae. tauschii* (155 days) accessions from the Baizak, Merken and T. Ryskulov districts of the Zhambyl province.

The plant height of local populations in most cases was presented by dwarf accessions: *Ae. tauschii* (35–46 cm), *Ae. cylindrica* (43–50 cm), *Ae. crassa* (25–41 cm) and *Ae. triuncialis* (41–52 cm) (see Fig. 3).

The length of the spike varied from short to very long (5–14 cm) (see Fig. 4). According to the length of the spike, all accessions were divided into 2 groups. A short spike (5–7 cm) was registered in *Ae. triuncialis* and *Ae. tauschii*; long (10–12 cm) and very long (≥ 14 cm) length of the spike in three species: *Ae. cylindrica* (Almaty, Zhambyl, South Kazakhstan provinces), *Ae. tauschii* (Almaty province) and *Ae. crassa* (Zhambyl, South Kazakhstan provinces). *Ae. cylindrica* was characterized by high intra-specific variation of spikelet number (5–13 pcs.) and spike density (0.5–1.1) (see Fig. 4).

The average number of spikelets per spike were: *Ae. cylindrica* – 8.8 pcs., *Ae. tauschii* and *Ae. crassa* – 8.2 pcs., *Ae. triuncialis* – 3.3 pcs. A relatively high number of spikelets per spike (13.0 pcs.) with a spike length of 12.0 cm was a characteristic for *Ae. cylindrica* species, collected in the Almaty province (spike density was 1.1). The average number of kernel per spike was generally low with intra-specific variations, depending on the site of collection: from 4 pcs. (*Ae. triuncialis*, Zhambyl province) to 14 pcs. (*Ae. tauschii*, Almaty province) (see Fig. 4). Phenotypic monitoring using an optical sensor “Greenseeker” showed that the accessions had a low NDVI biomass index – from 0.23 to 0.34, which is explained by their low productivity.

Rust fungi of wild cereals, as well as their host plants, are distinguished by a great variety of species. Wild relatives, in particular *Aegilops* L. genus can serve as sources and donors of wheat resistance. The introgression of rust resistance genes from wild species-relatives into commercial varieties is one of the genetic methods for increase of the bread wheat resistance (*Triticum aestivum* L.) (Koishibayev, 2002). Though a large number of resistance genes are available for breeding, the search for novel sources of resistance is of particular importance because of the changing virulence in the population of the pathogen as stressed by R.A. McIntosh and Z.A. Pretorius (2011). Susceptibility (MS – 40 %) to leaf rust was noted for the accessions of *Ae. cylindrica* from 2 districts (T. Ryskulov, Merken) of the Zhambyl province and *Ae. crassa* from the Ordabasy district of South Kazakhstan. Resistance to leaf rust on an artificial background was recorded for the accessions

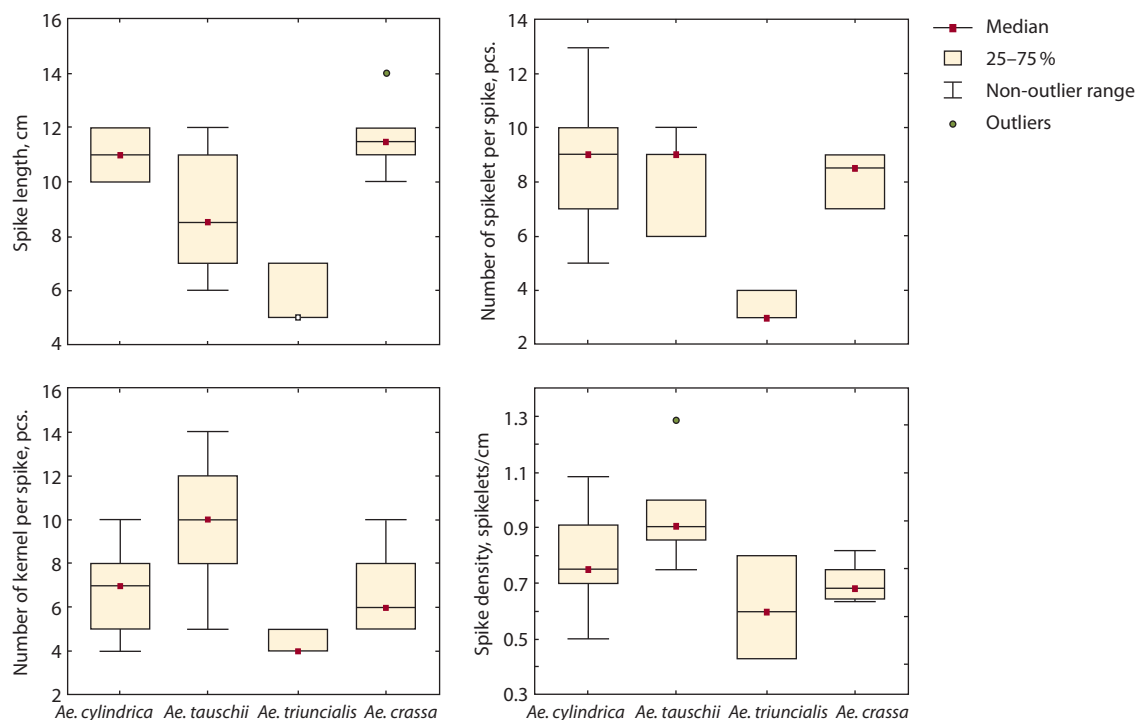


Fig. 4. Boxplots for 4 agronomical traits (spike length, number of spikelets per spike, number of kernel per spike and spike density) in *Ae. cylindrica*, *Ae. tauschii*, *Ae. triuncialis* and *Ae. crassa*.

of *Ae. triuncialis*, *Ae. tauschii*, *Ae. cylindrica* (Saryagash and Sayram districts) and *Ae. crassa* (Shardara and Sayram districts) from South Kazakhstan ($R = 0-5\%$).

Development and improvement of the methods of molecular genetic analysis opens up new opportunities for study of the population structure and the principles of spatial distribution of wild plant species. Polymorphism analysis of different sections of genomic DNA enables one to identify intraspecific genetic diversity, to reconstruct phylogenetic relationships between species and spatial relationships between populations, and also assess the well-being of the population and its ability to withstand adverse external influences, including anthropogenic ones. Molecular genetic studies make it possible to assess the level of DNA polymorphism in populations, intra-population genetic diversity, to establish the degree of genetic similarity between species, populations and individuals directly at the genetic level, in some cases to assess the heterozygosity of the population, and to study genetic variability in individual loci and gene alleles. Analysis of 50 accessions of local and foreign ecotypes of *Aegilops* spp. was carried out to assess the use of EST-SSRs microsatellite repeats, characterized by localization only in the coding part of the genome of the studied organisms. As shown by R. Bandopadhyay et al. (2004), these microsatellite markers are highly conserved for *Triticeae* and can be used in study of the genetic diversity of both intraspecific and intergeneric relationships between certain species of the same tribe. From the 64 EST-SSR markers, eleven were selected for our study: PK1, PK3, PK5, PK8, PK9, PK18, PK29, PK31, PK32, PK34, and PK57. The analysis of the informativeness and, thus, the justification of use of a specific marker in the future, was determined by statistical processing of the results for all the studied accessions as a whole. Of the eleven mark-

ers, eight were effective and provided the amplicons of the right size. The results of DNA amplification with markers PK3, PK8 and PK57 were difficult to interpret. For the rest, allelic polymorphic variants, frequency of occurrence for each of them separately, heterozygosity for each marker separately, and the average heterozygosity for the studied group were established. The most informative of all the studied markers were PK1 and PK5. So, for the PK1 marker the presence of five allelic variants was shown, and six were identified for PK5. Four alleles were detected for the PK18, PK31 and PK32 markers. For the remaining PK9 and PK29, PK34 markers, the presence of three and two alleles was demonstrated. High heterozygosity was detected for PK1 and PK18. It was found that 56 % of the accessions were heterozygous for the PK1 marker and 68 % – for PK18. This index for the other markers did not exceed 34 %. The PK29 and PK34 markers in the examined group showed only the presence of homogeneous accessions. In the studied group of plants, the average number of alleles was 2.73 per locus and the average heterozygosity reached 20 %. The frequency of occurrence, calculated for each allele, is presented in Table 2. The presence of three allelic variations in the PK9 marker was established in most accessions of *Ae. triuncialis* and *Ae. crassa* species. These species are characterized by hexaploid DMS genome for *Ae. triuncialis* species and DCDM for *Ae. crassa* (<http://herbarium.usu.edu/triticeae/genomesaegilops.htm>, circulation date 10.09.2016). Perhaps, the gene from which PK9 was developed is present in all three genomes of these species. Thus, it was established that the studied group of wild representatives of *Aegilops* genus was characterized by the presence of more variants of alleles in many of the studied markers, in comparison with the results obtained for *Ae. cylindrica* and

Table 2. Allele frequencies of polymorphic loci for all studied accessions

Marker	Allele	Frequency of occurrence
PK1 $H_o = 0.56$	1	0.3
	2	0.36
	3	0.04
	4	0.25
	5	0.05
PK5 $H_o = 0.18$	1	0.1
	2	0.46
	3	0.07
	4	0.27
	5	0.06
	6	0.04
PK9 $H_o = 0.32$	1	0.1233
	2	0.5533
	3	0.3234
PK18 $H_o = 0.68$	1	0.16
	2	0.47
	3	0.19
	4	0.18
PK29 $H_o = 0$	1	0.489
	2	0.511
PK31 $H_o = 0.16$	1	0.14
	2	0.17
	3	0.61
	4	0.08
PK32 $H_o = 0.34$	1	0.28
	2	0.5
	3	0.15
	4	0.07
PK34 $H_o = 0$	1	0.58
	2	0.32
$H_{ave} = 0.2; H_{ave\ exp} = 0.428$		

Note: H_o – heterozygosity of the locus, H_{ave} – average heterozygosity, $H_{ave\ exp}$ – average expected heterozygosity.

Ae. tauschii species. The revealed difference is most likely caused by high heterogeneity in the species, genomic and geographic features of the accessions.

Discussion

Agronomic traits. Wild plants have a capacity to adapt to environmental conditions. Phenotypic analyses revealed a significant variation within and between the populations. Since the heading time is an important adaptive trait in wild species, it remains possible that there is some relationship between geographical distribution and suitability for environmental conditions (Kato et al., 1998; Kooyers, 2015). In the present study, differences in the heading time were observed and it was assumed that these variations had been shaped in response to differences in the habitat environments of each species. Heading time coincide with the general strategy of adaptation to dry

conditions observed frequently in annual plants. Therefore, candidates for the drought tolerance traits can be selected from early heading (133–135 days) of the *Ae. cylindrica*, *Ae. tauschii* and *Ae. crassa* accessions that grow in areas with lower rainfall (South Kazakhstan province). These species could be useful as genetic resource for creating varieties that tolerate to the drought. In contrast, the *Ae. tauschii* accessions from Baizak, Merken, T. Ryskulov districts of the Zhambyl province had a longer heading time (155–158 days). The *Ae. cylindrica* and *Ae. tauschii* accessions from the same geographical region (Zhambyl province) were differed on heading time. The difference in a sympatric area could promote divergence of the species (i. e. act as a lead speciation event (Ohta et al., 2017)). This suggests that difference on heading time for *Ae. cylindrica* and *Ae. tauschii* reflects genetic differences between the two species rather than a phenotypic response to the environment. The heading time in these species will also improve the understanding of similar processes in wheat. The understanding of genetic control of such adaptation will be useful for future attempts to breed high stress-tolerant varieties of agriculturally-important crops, such as wheat (Bandou et al., 2009).

In the present study, clear differences were detected in agronomic traits (see Fig. 2–4). Accessions were distinguished successively by their spike length, number of spikelets per spike, number of kernel per spike, and spike density. The positive correlations indicating the possibility of using these species in wheat breeding was identified. The heading time was positively correlated in *Ae. triuncialis* with: (1) the number of spikelets per spike and the number of kernel per spike ($r = 0.89$); in *Ae. crassa* with: (1) number of kernel per spike ($r = 0.84$); (2) the length of the spike ($r = 0.56$). Plant height of *Ae. tauschii* highly correlated with: (1) the number of spikelets per spike ($r = 0.84$); (2) the number of kernel per spike ($r = 0.73$), and (3) the length of the spike ($r = 0.51$). The length of the spike had a high positive correlation with: (1) the number of spikelets per spike ($r = 0.82$) – *Ae. cylindrica*; ($r = 0.65$) – *Ae. crassa*; ($r = 0.76$) – *Ae. tauschii*; (2) the number of kernel per spike ($r = 0.84$) – *Ae. cylindrica*; ($r = 0.93$) – *Ae. tauschii*; ($r = 0.69$) – *Ae. crassa*.

Thus, by the conducted investigations, it was formation of *ex situ* collection of the *Aegilops* L. genus local populations reflecting the intra- and inter-population diversity. The sources of early ripeness, winter hardiness and resistance to diseases were identified.

Molecular-genetic analysis. The microsatellite analysis was carried out using 11 EST-SSR markers (PK1, PK3, PK5, PK8, PK9, PK18, PK29, PK31, PK32, PK34, and PK57). Of all these markers, eight markers were effective. For each marker, allele frequency and heterozygosity were calculated. The mean number of alleles was determined to be 2.73, and the average heterozygosity was 20 % for the studied group. The most informative of all the studied markers were PK1 and PK5. So, for PK1 marker, the presence of 5 allelic variants was demonstrated, and six were identified for PK5. The remaining markers showed the presence of 4 to 2 alleles. For hexaploid accessions of *Ae. crassa* species with PK9 marker three simultaneous allelic variants were established. The differences may enhance species divergence and could represent a lead speciation event. The results of this study will facilitate identification of populations or accessions of

wild wheat with favorable traits and/or novel adaptive genes. A bank of genomic DNA was created and put for *ex situ* storage (–70 °C, long-term) at the Institute of Molecular Biology and Biochemistry of the MES of the RK. Further studies on these traits in the complex will provide new insight into species differentiation and diversification.

Conflict of interest

The authors declare to have no conflict of interest.

References

- Alimgazinova B.Sh., Yessimbekova M.A. Plant genetic resources of Kazakhstan: status and prospects. Russ. J. Genet.: Appl. Res. 2013; 3(1):21-25. DOI 10.1134/S2079059713010036.
- Bandopadhyay R., Sharma Sh., Rustgi S., Singh R., Kumar A., Balyan H.S., Gupta P.K. DNA polymorphism among 18 species of *Triticum-Aegilops* complex using wheat EST-SSRs. Plant Sci. 2004; 166:349-356. DOI 10.1016/j.plantsci.2003.09.022.
- Bandou H., Rodriguez-Quirano M., Carrillo J.M., Branlard G., Zahariva M., Monneveux P. Morphological and genetic variation in *Aegilops geniculata* from Algeria. Plant Syst. Evol. 2009;277:85-97. DOI 10.1007/s00606-008-0106-z.
- Chen H., Moakhar N.P., Iqbal M., Pozniak C., Hucl P., Spaner D. Genetic variation for flowering time and height reducing genes and important traits in western Canadian spring wheat. Euphytica. 2016; 208:377-390. DOI 10.1007/s10681-015-1615-9.
- Engels J.M.M., Visser L. (Eds.). A Guide to Effective Management of Germplasm Collections. IPGRI Handbooks for Genebanks. No. 6. IPGRI, Rome, Italy, 2003.
- Grabovets A.I., Fomenko M.A. Some aspects of the winter wheat breeding for winter hardiness in the conditions of changing climate. Russ. Agric. Sci. 2015;41(1):1-4. DOI 10.3103/S1068367415010073.
- Gorash A., Armonienė R., Liatukas Ž., Brazauskas G. The relationship among freezing tolerance, vernalization requirement, *Ppd* alleles and winter hardiness in European wheat cultivars. J. Agric. Sci. 2017;155(9):1353-1370. DOI 10.1017/S0021859617000521.
- Holubec V. Triticeae biodiversity and conservation, a “genebanker” view. Czech J. Genet. Plant Breed. 2005;41:118-121.
- Holubec V. Monitoring, collection and conservation of landraces and wild plant genetic resources, in situ, on farm. Czech J. Genet. Plant Breed. 2010a;46:1-110.
- Holubec V. Monitoring of selected threatened species in Bohemia. Czech J. Genet. Plant Breed. 2010b;46:21-26.
- <http://herbarium.usu.edu/triticeae/genomesaegilops.htm>. Accessed 10.09.2016.
- Kamran A., Iqbal M., Spaner D. Flowering time in wheat (*Triticum aestivum* L.): a key factor for global adaptability. Euphytica. 2014;197: 1-26. DOI 10.1007/s10681-014-1075-7.
- Kato K., Tanizoe C., Beiles A., Nevo E. Geographical variation in heading traits in wild Emmer wheat, *Triticum dicoccoides*. II. Variation in heading date and adaptation to diverse eco-geographical conditions. Hereditas. 1998;128(1):33-39. DOI 10.1111/j.1601-5223.1998.00033.x.
- Koishibayev M.K. Diseases of Cereal Crops. Almaty, 2002. (in Russian)
- Kooyers N.J. The evolution of drought escape and avoidance in natural herbaceous populations. Plant Sci. 2015;234:155-162. DOI 10.1016/j.plantsci.2015.02.012.
- Likhenko I.E., Stasyuk A.I., Shcherban A.B., Zyryanova A.F., Likhenko N.I., Salina E.A. Analysis of the allelic variation of the *Vrn-1* and *Ppd-1* genes in Siberian early and medium early varieties of spring wheat. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2014;18(4/1):691-703. (in Russian)
- Maxted N., Kell S.P. CWR in crop improvement: to what extent are they used? Crop Wild Relative Newslett. 2009;7:1-7. Available online at <http://www.pgrsecure.org>
- Maxted N., Kell S.P., Ford-Lloyd B.V., Dulloo M.E., Toledo A. Toward the systematic conservation of global crop wild relative diversity. Crop Sci. 2012;52:774-785. DOI 10.2135/cropsci2011.08.0415.
- Maxted N., Magos Brehm J., Kell S. Conservation and Sustainable Use of PGRFA: A Toolkit for National Strategy Development. Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture. Rome, 2013.
- McIntosh R.A., Pretorius Z.A. Borlaug Global Rust Initiative provides momentum for wheat rust research. Euphytica. 2011;179:1-2. DOI <https://doi.org/10.1007/s10681-011-0389-y>.
- Ohta A., Yamane K., Kawahara T. Relationship between spike morphology and habitat of four *Aegilops* species of section Sitopsis. Genet. Resour. Crop Evol. 2017;64(5):889-899. DOI 10.1007/s10722-016-0408-x.
- Peterson R.F., Campbell A.B., Hannah A.E. A diagrammatic scale for estimating rust intensity of leaves and stem of cereals. Can. J. Res. Sect. 1948;C26:496-500.
- Prescott J.M., Burnet P.A., Saari E.E., Ransom J.K., Bowman J., de Milliano W., Singh R.P., Bekele G. Wheat Diseases and Pests: A Guide for Field Identification. Mexico: GTZ-CIMMYT, 2002.
- Reed B.M., Engelmann F., Dulloo M.E., Engels J.M.M. Technical Guidelines for the Management of Field and *in vitro* Germplasm Collection. IPGRI Handbooks for Genebanks. No. 7. IPGRI, Rome, Italy, 2004.
- Sitpaeva G.T., Yessimbekova M.A., Morgunov A.I., Karabaev M.K. On the current state of the genetic potential of cereals wild relatives in the southeast and east of Kazakhstan. Proc. of Int. Conf. “Development of Key Areas of Agricultural Sciences in Kazakhstan: Breeding, Biotechnology, Genetic Resources”. Astana, 2004;1:246-252. (in Russian)
- Urazaliev R.A., Alimgazinova B.Sh., Kenenbayev S.B., Yessimbekova M.A. Report on the establishment of the National Information Sharing Mechanism on PGRFA in the Kazakhstan Republic. World Information and Early Warning System on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. FAO (WIEWS), 2007. Available at <http://www.pgrfa.org/gpa/tha/advancedsearch.jspx>
- Yessimbekova M.A., Abugalieva A.I., Mukin K.B. Using of wheat wild relatives (*Aegilops* L.) diversity for balanced use. Proc. of the 4th Int. Conf. “Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics and Biotechnology”. Almaty, 2017;1:95.
- Yessimbekova M.A., Sitpaeva G.T., Kozhakhmetov K.K., Morgunov A.I., Karabaev M.K. Agrobiodiversity of agricultural crops in Kazakhstan: wild species and wild relatives. Vestnik Regional'noy Seti po Vnedreniyu Sortov Pshenitsy i Semenovodstvu = Bulletin of the Regional Network on the Introduction of Wheat Varieties and Seed Production. GTZ-CIMMYT, 2004;3(9):38-41. (in Russian)