

СОДЕРЖАНИЕ

Том 57, номер 7, 2021

Обзорные и теоретические статьи

- Регуляторы элонгации и архитектурные белки – новые участники транскрипции генов эукариот
Н. Е. Воробьева, М. Ю. Мазина 737
- МикроРНК как потенциальные биомаркеры сахарного диабета 2-го типа
З. Н. Тонян, Ю. А. Насыхова, А. А. Михайлова, А. С. Глотов 752
- Эксперимент по доместикации лисиц и эволюция собак с позиции современных молекулярно-генетических и археологических данных
Л. Н. Трут, А. В. Харламова, А. С. Пилипенко, Ю. Э. Гербек 767
-

Общая генетика

- Соотношение летальных и мутагенных повреждений в ДНК плазмид и бактериофагов, индуцированных 8-метоксипсораленом + УФ ($\lambda \geq 320$ нм)
В. Ю. Котова, С. К. Абилев, Г. Б. Завильгельский 786
-

Генетика животных

- Популяционная структура и происхождение некоторых экологических форм *Coregonus lavaretus pidschian* из р. Оленёк
Н. А. Бочкарев, Д. С. Сендек, Е. И. Зуйкова, Л. П. Пестрякова, Е. С. Захаров, Н. Н. Захарова, Л. П. Корякина, Д. В. Политов 797
- Генетическое разнообразие и филогения пуховых коз Центральной и Средней Азии
С. В. Бекетов, А. К. Пискунов, В. Н. Воронкова, С. Н. Петров, В. Р. Харзинова, А. В. Доцев, Н. А. Зиновьева, М. И. Селионова, Ю. А. Столповский 810
- Изменчивость контрольного региона митохондриальной ДНК и филогеография большого суслика (*Spermophilus major*, Sciuridae, Rodentia)
О. В. Брандлер, А. Р. Тухбатуллин, С. Ю. Капустина, Д. М. Щепетов, С. В. Титов, О. А. Ермаков 820
-

Генетика человека

- Спектр и новые патогенные варианты в гене *RS1* у российских больных X-сцепленным ретиношизисом
А. А. Степанова, Е. А. Иванова, В. В. Кадышев, А. В. Поляков 832
- Влияние дифференциальной экспрессии гена *ADAMTS1* на радиационно-индуцированный ответ клеточной линии HeLa
Р. Р. Савченко, А. А. Мурашкина, В. С. Фишман, Е. С. Сухих, А. В. Вертинский, Л. Г. Сухих, О. Л. Серов, И. Н. Лебедев, С. А. Васильев 842
-

Краткие сообщения

Оценка числа генов, полиморфизм которых влияет на уровень нейротизма

Т. И. Аксенович, Н. М. Белоногова, И. В. Зоркольева, Я. А. Цепилов

850

Contents

Vol. 57, No. 7, 2021

Reviews and Theoretical Articles

Regulators of Elongation and Architectural Proteins as New Participants of Eukaryotic Gene Transcription

N. E. Vorobyeva and M. Yu. Mazina 737

MicroRNAs as a Potential Biomarkers of Type 2 Diabetes

Z. N. Tonyan, Y. A. Nasykhova, A. A. Mikhailova, and A. S. Glotov 752

Fox Domestication Experiment and Dog Evolution: A View from the Perspective of Modern Molecular, Genetic and Archaeological Data

L. N. Trut, A. V. Kharlamova, A. S. Pilipenko, and Yu. E. Herbeck 767

General Genetics

The Ratio of Lethal and Mutagenic Damages in DNA of Plasmids and Bacteriophages after 8-Methoxypsoralen Plus Light ($\lambda \geq 320$ nm) Treatment

V. Yu. Kotova, S. K. Abilev, and G. B. Zavilgelsky 786

Animal Genetics

Population Structure of Whitefishes *Coregonus lavaretus pidschian* from the Olenek River: Revisiting the Origin of Ecological Forms

N. A. Bochkarev, D. S. Sendek, E. I. Zuykova, L. A. Pestryakova, E. S. Zakharov, N. N. Zakharova, L. P. Koryakina, and D. V. Politov 797

Genetic Diversity and Phylogeny of Fleece-Bearing Goats of Central and Middle Asia

S. V. Beketov, A. K. Piskunov, V. N. Voronkova, S. N. Petrov, V. R. Kharzinova, A. V. Dotsev, N. A. Zinovieva, M. I. Selionova, and Yu. A. Stolpovsky 810

Variability of the Mitochondrial DNA Control Region and Phylogeography of Russet Ground Squirrel (*Spermophilus major*, Sciuridae, Rodentia)

O. V. Brandler, A. R. Tukhbatullin, S. Yu. Kapustina, D. M. Schepetov, S. V. Titov, and O. A. Ermakov 820

Human Genetics

The Spectrum and Novel Mutations in *RS1* Gene in a Russian Cohort of Patients with X-Linked Retinoschisis

A. A. Stepanova, E. A. Ivanova, V. V. Kadyshchev, and A. V. Polyakov 832

Effect of *ADAMTS1* Differential Expression on the Radiation-Induced Response of HeLa Cell Line

R. R. Savchenko, A. A. Murashkina, V. S. Fishman, E. S. Sukhikh, A. V. Vertinsky, L. G. Sukhikh, O. L. Serov, I. N. Lebedev, and S. A. Vasilyev 842

Short Communications

Number of Genes Associated with Neuroticism Due to Their Polymorphisms

T. I. Axenovich, N. M. Belonogova, I. V. Zorkoltseva, and Ya. A. Tsepilov

850

РЕГУЛЯТОРЫ ЭЛОНГАЦИИ И АРХИТЕКТУРНЫЕ БЕЛКИ – НОВЫЕ УЧАСТНИКИ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ ЭУКАРИОТ

© 2021 г. Н. Е. Воробьева¹, М. Ю. Мазина¹, *

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

*e-mail: mazinam@genebiology.ru

Поступила в редакцию 03.08.2020 г.

После доработки 16.10.2020 г.

Принята к публикации 27.10.2020 г.

До последнего времени основными белками-корегуляторами транскрипции принято было считать комплексы, изменяющие структуру хроматина, – ремоделеры и модификаторы гистонов. Однако новейшие исследования механизмов регуляции транскрипции позволили внести уточнения в данную классификацию. Были выделены два дополнительных класса транскрипционных корегуляторов: регуляторы элонгации и белки/белковые комплексы, изменяющие трехмерную структуру хроматина. В данном обзоре мы суммировали наиболее свежую информацию о возможностях регулирования транскрипции генов эукариот посредством влияния на элонгацию и трехмерную структуру хроматина. Мы обсуждаем такие актуальные вопросы, как регуляция “паузинга” РНК-полимеразы II и скорости элонгации транскрипции, подавление криптической транскрипции в теле гена, а также роль белков/белковых комплексов в формировании обособленных топологических доменов и обеспечении связи между энхансерами и промоторами генов.

Ключевые слова: транскрипция, хроматин, энхансер, корегулятор, элонгация транскрипции, архитектурные белки.

DOI: 10.31857/S001667582106014X

Многие годы основными регуляторами процесса транскрипции генов эукариот, помимо общих факторов транскрипции РНК-полимеразы II, принято было считать комплексы, ремоделирующие и модифицирующие хроматин в области генов. Однако недавние успехи в развитии полногеномных технологий позволили значительно расширить данные представления. Так, в ряде работ было показано, что для большинства многоклеточных организмов стадии инициации транскрипции предшествует состояние “паузинга” РНК-полимеразы II на промоторах генов. В активации транскрипции таких генов велика роль комплексов, регулирующих элонгацию: они влияют на выход РНК-полимеразы II из состояния “паузинга” на промоторе и переход к элонгации транскрипции. К данной группе белков относят не только комплексы, взаимодействующие с РНК-полимеразой II и общими факторами транскрипции на промоторе, но и шапероны гистонов, ремоделирующие нуклеосомы перед полимеразой в кодирующих областях генов и определяющие эффективность элонгации.

Широко известно, что изменение спектра контактов промоторов с другими регуляторными элементами (энхансерами, инсульторами) влияет на экспрессию генов, однако долгое время данная информация была ограничена лишь отдельными

генетическими примерами. На сегодняшний день с развитием полногеномных методов анализа конформации хроматина (Hi-C, HiChIP, ChIA-PET) появляется все больше экспериментальных данных о роли контактов в хроматине и белков, эти контакты поддерживающих, в регуляции транскрипции. С использованием таких данных становится возможным строить емкие модели влияния архитектурных белков на транскрипцию функциональных групп генов в различные этапы онтогенеза.

В данном обзоре мы попытались объединить самую современную информацию о функциях двух новых классов транскрипционных корегуляторов, регуляторов элонгации и архитектурных белков, в транскрипции.

ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ КОМПЛЕКСЫ, РЕГУЛИРУЮЩИЕ ЭЛОНГАЦИЮ

Единственным общим транскрипционным регулятором, присутствующим у всех живых организмов от бактерий до человека и влияющим на процессивность транскрипции, является белок NusG/Spt5 [1, 2]. У многоклеточных организмов Spt5 функционирует в виде гетеродимера с Spt4, образуя регулятор элонгации транскрипции, названный DSIF (DRB-sensitive factor) [3]. Долгое

время факторами, влияющими на скорость элонгации, интересовались достаточно мало, так как считали, что основной регуляторный потенциал представлен белками, стимулирующими привлечение РНК-полимеразы II. Со временем стало понятно, что на промоторах многих генов многоклеточных РНК-полимераза II рекрутируется заранее, в неактивном состоянии, приводя их в состояние транскрипционной “паузы” [4, 5]. Регуляция транскрипции таких генов осуществляется путем стимуляции элонгации. Экспериментальные исследования, продемонстрировавшие широкое распространение “паузы” транскрипции в геноме, привлекли внимание к регуляторам элонгации транскрипции, таким как DSIF. Фактор DSIF взаимодействует с РНК-полимеразой II на промоторе генов, стимулируя транскрипционную “паузу” путем стабилизации комплекса, образуемого ферментом с негативным фактором транскрипции NELF [6]. Молекулярный механизм работы фактора DSIF хорошо иллюстрирует сложность и многоступенчатость процесса транскрипции (рис. 1,а).

На стадии инициации транскрипции фактор DSIF не способен связать РНК-полимеразу II, так как поверхность его взаимодействия с ферментом занята общими факторами транскрипции (такими как TFIIЕ) [7, 8]. Связывание DSIF с РНК-полимеразой II стимулируется появлением новосинтезированной РНК, с которой взаимодействует данный фактор [9]. В свою очередь, DSIF играет важную роль в экпировании новосинтезированной РНК для защиты ее от деградации [10]. У многоклеточных взаимодействие DSIF с РНК-полимеразой II стимулирует также связывание фактора NELF, который в свою очередь приводит к формированию репрессивной или временной транскрипционной “паузы” [6]. Выход РНК-полимеразы II из состояния “паузы” происходит путем фосфорилирования DSIF при помощи фактора р-TEFb, которое провоцирует отделение NELF и стимулирует элонгацию транскрипции [11]. Интересно, что р-TEFb фосфорилирует также NELF и саму РНК-полимеразу II, но главную роль в выходе из транскрипционной “паузы” играет именно фосфорилирование повторов в составе субъединицы Spt5 фактора DSIF. Отделение NELF от РНК-полимеразы II освобождает на ней поверхность для рекрутирования фактора TFIIС, необходимого для выхода из “паузы”, а также для связывания комплекса PAF1, позитивного регулятора элонгации транскрипции [12]. Таким образом, DSIF является активным участником ранних этапов транскрипции, начиная от синтеза первых нуклеотидов до образования продуктивного элонгирующего комплекса РНК-полимеразы II. В кодирующей области генов DSIF также играет важную роль, стимулируя процессивность РНК-полимеразы II, сплайсинг и образование мРНК [13–15].

Как видно из механизма работы DSIF, ключевым регулятором, разрушающим “паузу” транскрипции и провоцирующим переход комплекса РНК-полимеразы II в стадию продуктивной элонгации, является комплекс р-TEFb (состоящий из субъединиц CDK9 и CYCT). К настоящему моменту известно три основных способа рекрутирования р-TEFb к промоторам генов: в составе комплекса с Brd4, как часть Super Elongation Complex (SEC) или совместно с 7SK РНК. Исходно предполагалось, что именно Brd4 отвечает за привлечение комплекса р-TEFb к активно работающим промоторам путем ассоциации содержащихся в нем бромодоменов с ацетильными остатками гистонов [16]. Действительно, было показано, что активная фракция р-TEFb входит в состав комплекса с Brd4, а снижение внутриклеточного уровня белка Brd4 приводит к падению степени фосфорилирования РНК-полимеразы II по Ser2 в составе CTD (что является свидетельством нарушения работы CDK9). Однако недавно было показано, что нарушение связывания Brd4 с хроматином при помощи селективных ингибиторов не приводит к снижению уровня р-TEFb на промоторах генов [17]. Вероятно, основной функцией Brd4 во взаимодействии с р-TEFb является стимуляция функциональной активности, а не рекрутирование на промоторы. Именно способность Brd4 воздействовать на р-TEFb и, соответственно, элонгацию транскрипции сделала его перспективной фармацевтической мишенью. К настоящему моменту уже охарактеризован ряд селективных ингибиторов бромодоменов Brd4, многие из которых демонстрируют большой потенциал использования в качестве лекарственных препаратов [18, 19]. Также глубоко исследован механизм работы р-TEFb в составе комплекса SEC [20]. Дело в том, что гены, кодирующие субъединицы комплекса SEC, часто являются партнерами по транслокации с геном, кодирующим гистон-метилтрансферазу MLL [21]. Результатом такой транслокации является слитный белок, который провоцирует привлечение комплекса SEC (а вместе с ним и р-TEFb) к генам, регулируемым MLL-белком. Воздействие такого слитного регулятора приводит к высокоэффективной стимуляции элонгации транскрипции на генах-мишенях и развитию различных патологических состояний (в частности, наличие транслокаций гена MLL ассоциировано с острым лимфобластным и смешанным лейкозами) [22]. Альтернативным фактором, стимулирующим элонгацию транскрипции при помощи р-TEFb, является малая ядерная 7SK РНК. Исходно основной ролью 7SK РНК во взаимодействии с р-TEFb считалась регуляция активности р-TEFb посредством включения в неактивный киназный комплекс 7SK/HEXIM1/р-TEFb [23]. Однако недавно было описано, что 7SK РНК участвует и в рекрутировании 7SK/HEXIM1/р-TEFb-комплекса на хроматин: в

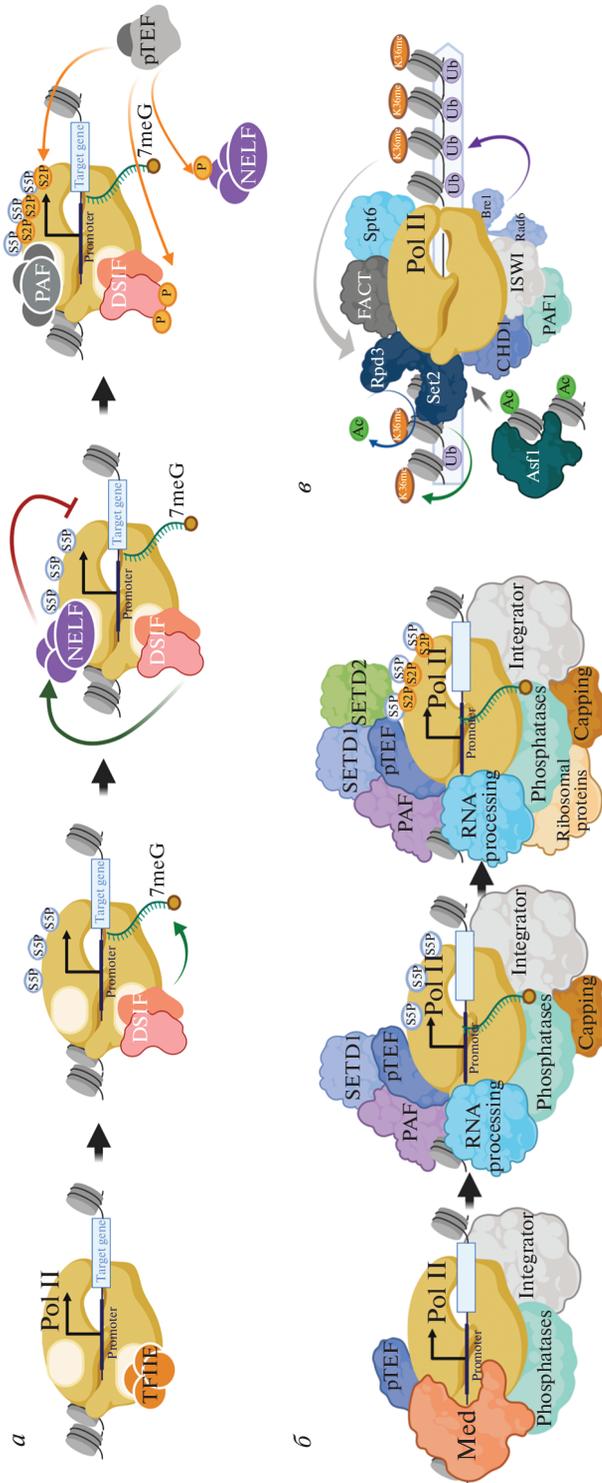


Рис. 1. *a* — роль фактора DSIF в начальных процессах транскрипции генов; *б* — транскрипционные корегуляторы, ассоциированные с РНК-полимеразой на различных этапах транскрипции. Приведены комплексы, связанные сразу после ее рекрутирования, с РНК-полимеразой, фосфорилированной по Ser5, которая инициировала транскрипцию и покинула промотор, а также с РНК-полимеразой, фосфорилированной по Ser2 в составе СТД, которая находится в стадии продуктивной элонгации; *в* — роль ковалентных модификаций хроматина, а также корегуляторов, ассоциированных с РНК-полимеразой, в ингибировании кригической транскрипции в теле гена в ходе элонгации. Для рис. 1 и 2: более детальное описание приведено в тексте. Там же приводятся ссылки на работы, послужившие основой для формирования молекулярных моделей процессов, ассоциированных с транскрипцией. Все модели были созданы при помощи приложения BioRender.com.

ChIP-seq экспериментах было обнаружено, что данным комплексом обогащены промоторы более 15000 генов человека [24]. Считается, что активация рекрутированного на хроматин комплекса 7SK/HEXIM1/p-TEFb способствует быстрому повышению концентрации p-TEFb на промоторах за счет связывания комплекса ген-специфическими транскрипционными факторами.

Стоит отметить отдельно, что комплекс p-TEFb является не только стимулятором выхода комплекса РНК-полимеразы II из состояния “паузы”, но и модулятором ее активности в процессе элонгации. Тот факт, что степень фосфорилирования Ser2 в составе STD домена РНК-полимеразы II возрастает по мере продвижения ее по гену, свидетельствует об активности комплекса, ответственного за данный тип фосфорилирования на протяжении всего процесса элонгации. Вероятно, p-TEFb входит в состав элонгирующего комплекса РНК-полимеразы II. Это предположение подкрепляется и функциональными данными, свидетельствующими об активной роли p-TEFb в ранних и поздних этапах элонгации, а также его вкладе в регуляцию терминации транскрипции и полиаденилирования [25]. Регулирование степени фосфорилирования STD РНК-полимеразы II, а также повторов в составе Spt5, используется клеткой для управления скоростью продвижения элонгирующего комплекса по гену. Отмечено, что снижение скорости транскрипции в сайте полиаденилирования связано со снижением степени фосфорилирования РНК-полимеразы II и Spt5. Замедление элонгирующего комплекса происходит под воздействием фосфатазы PP1, регулируемой CDK9. В сайте полиаденилирования PP1 дефосфорилирует Spt5 в составе DSIF, что приводит к замедлению продвижения РНК-полимеразы II по гену и провоцирует начало терминации транскрипции и полиаденилирования [26]. Отмечено, что поддержание определенной скорости продвижения РНК-полимеразы II по гену имеет существенное значение для правильного сворачивания мРНК [27] и альтернативного процессинга РНК. Действительно, в ряде работ показано, что изменение скорости элонгации РНК-полимеразы II влияет на выбор сайта сплайсинга, последующее включение экзонов в состав мРНК и на эффективность сплайсинга [28–30].

STD-домен РНК-полимеразы II содержит в своем составе множество гептааминокислотных повторов, подвергающихся ковалентным модификациям в процессе транскрипции. Этот белковый домен, обладающий различными свойствами на различных этапах транскрипционного процесса (благодаря изменению типа и степени модификации), служит платформой для связывания комплексов, участвующих в инициации, элонгации и терминации транскрипции [31]. Недавно была проведена биохимическая очистка белковых

комплексов, ассоциированных с STD-доменами РНК-полимеразы II, которые были модифицированы различным образом (нефосфорилированных, фосфорилированных по Ser5 в STD посредством CDK7, а также фосфорилированных по Ser2 в STD посредством CDK9) [32]. Результаты данного эксперимента вполне соответствуют принятой модели участия комплексов в транскрипционном процессе, основанной на различных исследованиях (рис. 1, б) [33]. Было показано, что немодифицированная РНК-полимераза II ассоциирована с комплексами Mediator, Integrator и набором различных фосфатаз. Фосфорилирование РНК-полимеразы II по Ser5 в составе STD (которое происходит одновременно с началом синтеза РНК, ее кэпированием и покиданием промотора РНК-полимеразой) приводит к нарушению контактов с Mediator, но появлению в комплексе факторов процессинга РНК, кэпирующих ферментов и комплекса PAF1. Элонгирующая РНК-полимераза, фосфорилированная по Ser2 в составе STD, также ассоциирована с факторами процессинга РНК, комплексами Integrator и PAF1. Интересно, что STD-домен РНК-полимеразы имеет белковые контакты с ферментативными комплексами, модифицирующими хроматин. Так, было обнаружено, что фосфорилирование STD РНК-полимеразы II по Ser5 не только приводит к его взаимодействию с комплексом SETD1 A/B, вносящим метилирование по лизину 4 гистона H3, но и стимулирует ферментативную активность данного комплекса [32]. Биохимические данные, полученные при исследовании комплексов, связанных с STD РНК-полимеразы II, недавно были подтверждены микроскопическими исследованиями. Судя по всему, фосфорилирование STD РНК-полимеразы II играет важную роль в фазовом переходе, который проходит элонгирующий фермент в процессе транскрипции между конденсатами, отвечающими за инициацию транскрипции (и обогащенными энхансер-ассоциированными белками, в частности Mediator) и процессинг РНК (включающими в себя факторы сплайсинга) [34].

Известно, что кодирующие области активно работающих генов эукариот заполнены нуклеосомами. Преодоление транскрибирующим комплексом РНК-полимеразы II этих нуклеосом является достаточно сложной задачей. Гены, транскрипция которых происходит на чрезвычайно высоком уровне (обычно в условиях стресса), теряют нуклеосомы в кодирующей области, чтобы обеспечить возможность экстремально высокой степени активации. Примером такого гена является шаперон *hsp70*, транскрипция которого активируется в условиях теплового шока [35]. Освобождение гена *hsp70* от нуклеосом в ходе активации его транскрипции связывают с активностью белка PARP (poly(ADP-ribose) polymerase) [36]. В то же время гены, транскрибирующиеся в нормальных

условиях на среднем уровне, обычно не демонстрируют сколько-нибудь значимого снижения уровня нуклеосом в кодирующей области. Полагают, что сохранение нуклеосом в генах является важным механизмом, который препятствует развитию криптической транскрипции – инициации синтеза РНК вне промоторов генов [37]. Таким образом, элонгирующий комплекс РНК-полимеразы II представляет собой эффективную систему, которая, с одной стороны, имеет возможность транскрибировать сквозь хроматин (преодолевать нуклеосомы), а с другой, – восстанавливать связь нуклеосом с ДНК после прохождения фермента для подавления криптической транскрипции. Для реализации данной программы РНК-полимераза II взаимодействует с рядом транскрипционных комплексов, многие из которых ассоциированы с ней на протяжении всего процесса элонгации [38]. Позитивную роль в преодолении РНК-полимеразой II нуклеосомного барьера играют гистоновые шапероны FACT и Spt6, а также ISWI и CHD1 комплексы, ремоделирующие хроматин [39–41]. Причем активность ремоделирующих комплексов в процессе элонгации регулируется ковалентными модификациями хроматина [37]. Поддержание определенного набора ковалентных модификаций хроматина в кодирующих областях генов играет ключевую роль и в подавлении криптической транскрипции (рис. 1, в). Так, в ходе элонгации гистоновый шаперон Asf1 восстанавливает состав нуклеосом вслед за РНК-полимеразой II [42, 43]. В процессе такого восстановления в кодирующую область гена попадают ацетилированные гистоны, присутствующие во внутриклеточном пуле. Ацетилирование гистонов, в свою очередь, провоцирует криптическую транскрипцию в кодирующей области. Для преодоления данной проблемы в состав элонгирующего комплекса РНК-полимеразы II включены компоненты деацетилазного комплекса Set2–Rpd3 [44]. Причем активность данных деацетилаз зависит от наличия ковалентной модификации H3K36me3 на нуклеосомах в кодирующей области гена [45]. Поддержание модификации H3K36me3, а также H2BUb, на нуклеосомах кодирующей области снижает уровень обмена гистонов в данных районах генома и, как следствие, препятствует криптической транскрипции [45, 46]. Как и H3K36me3, модификация H2BUb вносится на хроматин котранскрипционно. В этом процессе ведущую роль играют комплексы PAF и CHD1, ассоциированные с фосфорилированным STD-доменом РНК-полимеразы II [47]. Недавно было обнаружено, что Rtf1-субъединица комплекса PAF напрямую стимулирует убиквитинилирование H2B, взаимодействуя непосредственно с комплексом Rad6/Bre1, ассоциированным с полимеразой [48]. Вполне вероятно, что все факторы, регулирующие скорость продвижения РНК-полимеразы II в теле гена, могут

иметь непосредственное отношение к качеству синтезированной геном РНК. К сожалению, в настоящее время полногеномная оценка качества синтеза РНК является технически трудной задачей, для решения которой необходим дальнейший прогресс экспериментальных подходов [49].

ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ КОМПЛЕКСЫ, ИЗМЕНЯЮЩИЕ 3D-СТРУКТУРУ ХРОМАТИНА

Регуляция транскрипции генов при помощи изменения трехмерной структуры ДНК – эволюционно древний процесс. Системы регуляции транскрипции, основанные на принципе приближения удаленного ДНК-связывающего активаторного белка к промотору гена, который он регулирует, встречаются даже у бактерий [50]. Более того, у бактерий имеются специализированные белки, обеспечивающие процесс образования петель ДНК [51]. Увеличение размера генома у более сложных организмов приводит к тому, что белки, изменяющие структуру ДНК, начинают играть еще более важную роль в регуляции транскрипции генов.

На протяжении долгого времени модели процессов регуляции транскрипции, основанные на изменении трехмерной структуры ДНК, были в некоторой степени гипотетическими. Они хорошо объясняли результаты многих функциональных экспериментов (например, генетических) [52]. Однако факт непосредственного взаимодействия удаленных участков ДНК долгое время было невозможно установить экспериментально (как и точно локализовать взаимодействующие участки ДНК в геноме). Ситуация существенно изменилась вместе с изобретением экспериментальных методик, позволяющих регистрировать непосредственную ассоциацию элементов ДНК в различных клетках, – методик фиксации состояния хроматина, называемых еще “С-методами” (3C, “chromatin conformation capture”, и его модификации) [53]. Применение “С-методов” продемонстрировало, что геномы многоклеточных организмов разделены на области, обогащенные хроматиновыми контактами (названные топологически ассоциированными доменами – TAD), и области, обедненные контактами и названные границами TAD [54]. Имеющиеся в геноме TADs можно разделить на активные (имеющие в своем составе активно работающие гены) и неактивные (содержащие неактивные гены, а часто и ковалентные модификации, присущие компактизованному хроматину). Тип TAD хорошо предсказывает время его репликации – активные реплицируются в ранней S-фазе клеточного цикла. Кроме того, характеристика TAD связана с плотностью контактов внутри него – неактивные TAD демонстрируют большую плотность контактов, вероятно связанную с более плот-

ной компактизацией хроматина в данном районе. Исследования разных типов клеток, а также разных стадий развития организмов показали, что разделение генома на TAD является очень устойчивой характеристикой. Отдельные локусы демонстрируют даже эволюционную консервативность TAD-структуры [55].

Исследования структуры геномов демонстрируют нам по крайней мере два совершенно различных уровня функциональной организации трехмерной структуры ДНК: 1) устойчивый уровень, характерный для многих типов клеток (включающий в себя белки и геномные элементы, организующие TAD и их границы), а также 2) динамический уровень, отвечающий на изменение состояния клеток (включающий в себя белки и геномные элементы, организующие динамическую ассоциацию энхансеров и промоторов). Без сомнения оба уровня трехмерной организации генома играют огромную роль в регуляции транскрипции генов. Однако принципы их участия в работе генов различны.

Белки и белковые комплексы, организующие топологически ассоциированные домены

Как уже упоминалось выше, присутствие гена в TAD определенного типа предсказывает его активность. Трансген, встроенный в неактивный TAD, с большой вероятностью не будет транскрибироваться. В соответствии с этим фактом изменение границ TADs оказывает значительное влияние на работу входящих в них генов. Данный феномен лучше всего изучен на модельных локусах, для которых хорошо исследована их структура, а также известны регуляторные элементы и их функциональная активность. Так, в раннем эмбриональном развитии *Hox*-гены млекопитающих, отвечающие за рост и формирование организма, формируют один общий TAD с регуляторными областями. Изменение активности генов, происходящее в ходе развития, приводит к изменению топологической структуры локуса и формированию двух отдельных TAD, различных по транскрипционному статусу [56]. Изменение границы между данными TAD приводит к нарушению транскрипционного статуса генов данного района [57]. Другая топологическая граница разделяет регуляторные элементы генов *Tfap2c* и *Vmp7*, обеспечивая независимый характер работы тканеспецифических энхансеров данного локуса [58].

Несмотря на то что функциональная значимость границ TAD продемонстрирована во многих модельных системах, молекулярный механизм формирования таких границ до сих пор недостаточно ясен. Более того, экспериментальные данные предполагают наличие различных механизмов образования границ для разных организмов [59]. Так, у млекопитающих основным механизмом образо-

вания TAD предполагается образование петель когезиновым комплексом при участии инсульторного белка CTCF, действие которого ограничивает распространение петли [60, 61]. Данную гипотезу подтверждают данные экспериментов Hi-C высокого разрешения, которые демонстрируют наличие петли ДНК (обогащенного контактами участка) между границами TAD. В настоящее время считается, что механизм образования TAD посредством действия когезина и CTCF отсутствует у дрозофилы. Во всяком случае границы TAD у нее не образуют видимых петель. Формирование TAD в раннем эмбриогенезе дрозофилы хорошо коррелирует с активацией транскрипции генов. Высказывались предположения, что именно транскрипционная активность генов домашнего хозяйства формирует границы TAD у дрозофилы [62]. Однако ингибирование транскрипции в раннем эмбриогенезе не нарушает образование TAD полностью, демонстрируя тем самым важную, но не ведущую роль транскрипции в данном процессе [63]. Интересно, что ингибирование транскрипции у до-имплантационного эмбриона мыши также не препятствует образованию TAD [64]. Более серьезный эффект на образование структуры хроматина в раннем эмбриогенезе млекопитающих оказывает ингибирование репликации [65]. Вместе эти данные хорошо иллюстрируют отсутствие в настоящее время единого мнения о механизме образования TADs и их границ. Многие белки могут играть роль в их поддержании, но важны ли они для образования данного TAD в ходе развития — доказать достаточно сложно.

Конечно, белки, отвечающие за сохранение границ TAD, важны для поддержания адекватного уровня транскрипции входящих в них генов. Сохранение границ обеспечивает возможность своевременного образования петель от энхансеров и сайленсеров, играя существенную роль в динамической регуляции транскрипции генов в ходе развития [66, 67]. Ярким примером этого является белок CTCF млекопитающих, активность которого важна для сохранения границы в составе *Hox*-локуса и поддержания репрессированного состояния генов в неактивном TAD (рис. 2,а) [57]. Как упоминалось выше, роль инсульторных белков в поддержании границ хроматиновых доменов была продемонстрирована задолго до появления “С-методов” [68]. Поэтому сразу после появления методик полногеномного исследования структуры хроматина они стали считаться наиболее вероятными кандидатами на роль белков, ответственных за поддержание 3D-архитектуры генома. Так, уже в самых первых исследованиях Hi-C геномов млекопитающих указывалось на участие инсульторного белка CTCF в организации границ TAD [54]. Годы исследований еще более укрепили функциональную роль CTCF в качестве белка, сохраняющего границы TAD у млекопитающих [69]. Стоит

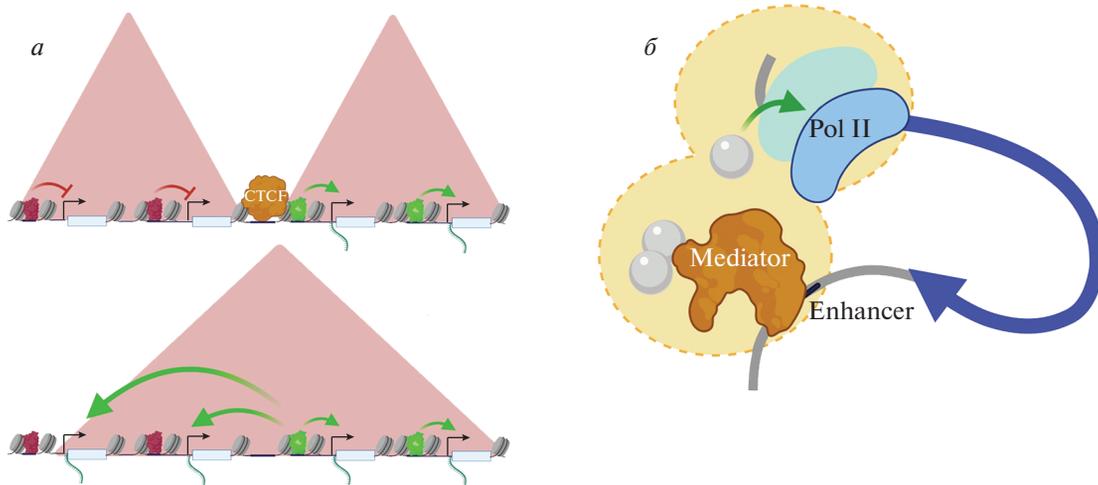


Рис. 2. *а* – роль CTCF в организации топологически ассоциированных доменов в *Hox*-локусе млекопитающих. Нарушение границы приводит к активации генов в составе репрессированного домена; *б* – механизм ассоциации энхансера и промотора гена на основе взаимодействия между “жидкими” областями, образованными вокруг каждого из регуляторных элементов. Данные области образуются при участии неструктурированных областей белков, входящих в состав преинициаторного комплекса, а также комплекса Mediator.

отметить, что роль CTCF в организации границ у дрозофилы продемонстрирована менее явно. Предполагается, что поддержание границ TAD у этого организма организовано при участии многих инсуляторных белков, таких как BEAF-32, Chromator и CP190 [70, 71]. С другой стороны, данные типы инсуляторных белков дрозофилы колокализуются в геноме с активными регуляторными элементами (такими, как промоторы генов) [72]. Может оказаться, что за сохранение границ TAD у дрозофилы отвечают какие-то другие регуляторные белки, присутствующие в геноме на инсуляторах данного типа.

В основном границы областей TAD стабильны на протяжении развития и сохраняются в различных тканях. Изменение положения границ обычно происходит однократно, сопровождается глобальным изменением транскрипционного статуса хроматинового района и сохраняется в дальнейшем в развитии (как изменения в структуре локуса *Hox*-генов млекопитающих, которые происходят в ходе дифференцировки ткани). Медленный характер изменений в структуре генома хорошо иллюстрирует динамика изменения сайтов связывания инсуляторных белков под воздействием сигнала развития. На клеточной линии Kc дрозофилы было показано, что воздействие на нее гормона развития 20-гидроксиэктона приводит к появлению новых сайтов связывания для инсуляторных белков Su(Hw) и CP190 [73]. Однако для такого глобального изменения хроматина необходимо длительное воздействие индуцирующего сигнала (эффект наблюдается только после 48 ч воздействия гормона на клетки).

Белки и белковые комплексы, обеспечивающие взаимодействие удаленных регуляторных элементов и промоторов генов

Разделение генома клетки на топологически обособленные домены основано на частоте контактов внутри района. В отдельные домены выделяют участки хроматина, обогащенные множественными контактами. Основную массу контактов внутри TAD составляют динамические взаимодействия между элементами ДНК, регулирующими транскрипцию и репликацию. Именно изменение таких внутридоменных контактов происходит под воздействием сигналов стресса или развития, что реализуется в изменении паттерна транскрипции генов. Конечно, белки, провоцирующие или нарушающие динамическую связь между регуляторными элементами, влияют на транскрипцию генов и являются тем самым транскрипционными корегуляторами.

Лучше всего исследованы механизмы становления контактов внутри топологических районов на примере взаимодействия энхансеров и промоторов генов [74]. В некоторых случаях именно взаимодействие энхансера с промотором является триггером, достаточным для активации транскрипции гена. Так, искусственное рекрутирование локус-контролирующего района LCR к промотору β -глобинового гена приводит к активации его транскрипции [75]. В норме сближение LCR и промотора β -глобинового гена обеспечивается согласованной работой транскрипционного фактора GATA1 и белка Ldb1 [76]. Тем не менее для многих генов было показано, что взаимодействие их промоторов с энхансерами не связано с индукцией транскрипции и происходит за-

долго до активации гена. В частности, энхансеры эдизон-зависимых генов дрозофилы ассоциированы с промоторами генов в неактивном состоянии [77]. Показано, что важную роль в организации структуры хроматина отдельных генов эдизонного каскада играют компоненты ядерной поры. Полногеномное исследование контактов энхансеров и промоторов в клетках человека позволило обнаружить корреляцию между силой контактов и уровнем маркера H3K27Ac в хроматине энхансеров [78]. Было обнаружено, что “стабильные” энхансеры, установившие контакты с промоторами генов задолго до активации транскрипции, характеризуются высоким уровнем данного маркера хроматина. Вероятно, активность транскрипционного регулятора СВР/p300, присутствующего на энхансерах, связана с образованием контактов между энхансером и промотором.

Логично предположить, что в установлении контактов промотора с энхансерами принимают участие компоненты преинициаторного комплекса или даже сама РНК-полимераза II. На первый взгляд данному предположению противоречат экспериментальные данные, демонстрирующие наличие контактов между промоторами и энхансерами неактивных генов. Однако детальное исследование динамики контактов между регуляторными элементами в раннем эмбриональном развитии дрозофилы показало, что стабильные контакты энхансеров с промоторами неактивных генов связаны с присутствием на промоторах РНК-полимеразы II в состоянии транскрипционной “паузы” [79]. То есть сама РНК-полимераза II может быть активным участником процесса формирования и поддержания динамических контактов в геноме. В том же исследовании было продемонстрировано, что лишь в половине энхансеров, установивших контакты с регулируемым ими промоторами, присутствуют сайты связывания для инсульторных белков. Данный факт подтверждает ранее высказанное предположение о ведущей роли инсульторных белков в стабильных, но не динамических трехмерных взаимодействиях в хроматине.

Среди компонентов преинициаторного комплекса ведущую роль в организации взаимодействий между энхансерами и промоторами генов играют компоненты комплекса Mediator. Данный комплекс представляет собой мультибелковую структуру, которая связывает энхансеры и управляет процессом инициации транскрипции на промоторе [80, 81]. Служа платформой для действия многих корегуляторов, Mediator координирует различные этапы транскрипции генов. Сближение Mediator с регулируемым промотором является одним из ключевых моментов активации транскрипции гена и происходит путем образования петли между энхансером и промотором. Взаимодействие субъединиц Mediator с когезино-

вым комплексом указывает на то, что данный комплекс может принимать непосредственное участие в формировании этой петли [82, 83]. С другой стороны, последние исследования противоречат модели физического контакта Mediator одновременно с энхансерами и промоторами генов [84]. Предполагается, что данный комплекс лишь сближается с регулируемым промотором, оказывая на него функциональное воздействие, но не устанавливая устойчивого контакта.

В последнее время большую популярность получила модель взаимодействия энхансеров и промоторов путем формирования в ядре обособленных жидких безмембранных органелл [85]. Ранее описанным примером подобных внутриядерных органелл являются тельца Кахалы, содержащие в своем составе факторы биогенеза мРНК [86]. В соответствии с данной моделью компоненты преинициаторного комплекса, а также регуляторы, ассоциированные с энхансерами, несут в составе своих белковых компонентов множество неструктурированных доменов, которые способствуют образованию в районе регуляторных элементов “жидких” областей с особыми химическими свойствами. Свойства данных областей таковы, что способствуют слиянию их в единое целое и, соответственно, сближению участков промотора и энхансера (рис. 2,б) [87]. Особые свойства данных областей позволяют попавшим в них транскрипционным регуляторам двигаться с большей скоростью и повышают вероятность функционального воздействия белкового регулятора на регуляторный элемент ДНК. В контексте данной теории особую роль приобретают пока не охарактеризованные белки, способствующие созданию “жидких” областей в районе энхансера и промотора, а также их объединению. Другими немаловажными регуляторами являются также белки, облегчающие фазовый переход на границе подобных областей для регуляторов транскрипции [34]. Поиск и характеристика свойств транскрипционных регуляторов, организующих фазовые переходы внутри ядра, — удел будущих исследований.

В настоящее время сложно выделить ведущую молекулярную модель, которая бы описывала механизм, обеспечивающий взаимодействие энхансера и промотора. До сих пор устойчивыми являются многие модели образования петель: 1) за счет элонгации РНК-полимеразы; 2) за счет олигомеризации ДНК-связывающих белков; 3) за счет образования петли при участии комплексов когезина и конденсина, а также Nipped-B; 4) за счет разделения фаз [76, 87–90]. Многие белки и белковые комплексы, опосредующие образование петель ДНК в рамках данных моделей, играют одновременно функциональные роли регуляторов транскрипции и архитектурных белков. Но для большинства из них установить ведущую и косвенную функции на основе имеющейся экс-

Таблица 1. Классификация транскрипционных корегуляторов

Название белка/белкового комплекса	Функциональная (каталитическая/ ферментативная) субъединица	Молекулярные функции	Способ привлечения к регуляторному элементу
Регуляторы элонгации			
y/d/hDSIF	y/d/hSpt5	Участвует в кэпировании мРНК посредством стимуляции активности мРНК-гуанилил-трансферазы [91]. Стимулирует паузинг РНК-полимеразы II на промоторе посредством стабилизации комплекса РНК-полимеразы II с NELF [6]. Стимулирует процессивность РНК-полимеразы II, сплайсинг и образование мРНК [13–15]	РНК-опосредованное взаимодействие с РНК-полимеразой II на этапе инициации транскрипции [9]. Диссоциация путем фосфорилирования фактором p-TEFbDSIF и NELF [11]
d/hNELF	d/hNELFA, d/hNELFB, d/hNELFD, d/hNELFE	Экранирует поверхность РНК-полимеразы II, необходимую для рекрутирования TFIIIS и связывания PAF1 [12]	Связывание с РНК-полимеразой II кооперативно с DSIF [6]
y/d/h p-TEFb	y/d/hCDK9	Стимулирует элонгацию посредством фосфорилирования факторов паузинга DSIF, NELF и РНК-полимеразы II [11]	Рекрутирование к промоторам в составе комплекса с Brd4, 7SK RNA или как части Super Elongation Complex (SEC) [20]
y/d/hPAF1	y/d/hPAF1	Регулирует паузинг РНК-полимеразы II [92] и совместно с DSIF регулирует элонгацию транскрипции [93]. Стимулирует убиквитинирование H2B, взаимодействуя с комплексом Rad6/Bre1 [48]	Связывание с CTD-доменом РНК-полимеразы II [12]
d/hIntegrator	d/hIntS9, d/hIntS11 – РНК-эндонуклеазы	Участвует в терминации транскрипции паузированной РНК-полимеразы II [94]. Регулирует отрезание U1 и U2 snRNA сплайсосомы, транскрипцию энхансерной eRNA [95]	Связывание с CTD-доменом РНК-полимеразы II [96]
Шапероны гистонов			
y/d/hFACT	d/hSSRP1, y/d/hSpt1, yPob3	Способствует преодолению РНК-полимеразой II нуклеосомного барьера промотора, прохождению ею нуклеосом в кодирующей области генов [97]	Взаимодействие с CTD-доменом РНК-полимеразы II [98]

Таблица 1. Окончание

Название белка/белкового комплекса	Функциональная (каталитическая/ ферментативная) субъединица	Молекулярные функции	Способ привлечения к регуляторному элементу
Белки, изменяющие 3D-структуру хроматина			
d/hCTCF	d/hCTCF	Регулирует образование петель хроматина внутри локусов генов [57, 99], совместно с когезином формирует границы TADs [60, 61, 69, 83] и специфическую для типа клеток 3D-структуру хроматина [100]	Связывание со специфическим мотивом ДНК [101]
dBEAF-32	dBEAF-32	Участвует в поддержании границ TADs [71]	Связывание со специфическим мотивом ДНК [102]
dCP190	dCP190	Участвует в поддержании границ TADs [71], в формировании энхансер-промоторных петель [66, 73]	Связывание хроматина посредством взаимодействия с ДНК-связывающими инсуляторными белками [103, 104] и ядерными рецепторами [66]
y/d/hMediator		Связывает энхансеры и регулирует процесс инициации транскрипции на промоторе [80, 81]	Образование энхансер-промоторных петель происходит, возможно, посредством взаимодействия с когезином [82, 83]

Примечание. y – дрожжи, d – дрозофила, h – человек.

периментальной информации пока не представляется возможным.

В табл. 1 мы приводим описание основных регуляторов транскрипции, рассмотренных в данном обзоре.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние годы развитие полногеномных методов исследования позволило существенно дополнить наши знания о функциях разнообразных белков и белковых комплексов-корегуляторов в процессах инициации и элонгации транскрипции. Так, если раньше считалось, что стимуляция транскрипции гена требует рекрутирования к промотору общих факторов транскрипции, РНК-полимеразы II, комплексов ремоделирования и модификации хроматина, то современные данные свидетельствуют скорее в пользу существования на большинстве генов многоклеточных инициаторного комплекса полимеразы в состоянии “паузинга”. Показано, что процесс активации и регуляции транскрипции на разных генах, в

различных тканях, на отдельных этапах онтогенеза может задействовать огромное разнообразие механизмов. Для того, чтобы отследить наиболее важных участников и биологические закономерности, которым эти механизмы подчиняются, сформировать единую экспериментальную модель транскрипционного процесса, потребуется еще много работы. В данном обзоре мы постарались начать ее выполнение.

Данная работа была поддержана грантом Российского научного фонда № 18-14-00219 (рук. Н.Е. Воробьева).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Blombach F., Smollett K.L., Grohmann D., Werner F.* Molecular mechanisms of transcription initiation-structure, function, and evolution of TFE/TFIIIE-Like factors and open complex formation // *J. Mol. Biol.* 2016. V. 428. № 12. P. 2592–2606. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.04.016>
2. *Werner F.* A Nexus for gene expression – molecular mechanisms of Spt5 and NusG in the three domains of life // *J. Mol. Biol.* 2012. V. 417. № 1. P. 13–27. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.01.031>
3. *Wada T., Takagi T., Yamaguchi Y. et al.* DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs // *Genes Dev.* 1998. V. 12. № 3. P. 343–356.
4. *Adelman K., Lis J.T.* Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: Emerging roles in metazoans // *Nat. Rev. Genet.* 2012. V. 13. № 10. P. 720–731. <https://doi.org/10.1038/nrg3293>
5. *Muse G.W., Gilchrist D.A., Nechaev S. et al.* RNA polymerase is poised for activation across the genome // *Nat. Genet.* 2007. V. 39. № 12. P. 1507–1511. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.21>
6. *Yamaguchi Y., Inukai N., Narita T. et al.* Evidence that negative elongation factor represses transcription elongation through binding to a DRB sensitivity-inducing factor/RNA polymerase II complex and RNA // *Mol. Cell. Biol.* 2002. V. 22. № 9. P. 2918–2927. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.9.2918-2927.2002>
7. *Larochelle S., Amat R., Glover-Cutter K. et al.* Cyclin-dependent kinase control of the initiation-to-elongation switch of RNA polymerase II // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2012. V. 19. № 11. P. 1108–1115. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2399>
8. *Schulz S., Gietl A., Smollett K. et al.* TFE and Spt4/5 open and close the RNA polymerase clamp during the transcription cycle // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. № 13. P. E1816–E1825. <https://doi.org/10.1073/pnas.1515817113>
9. *Vos S.M., Farnung L., Urlaub H., Cramer P.* Structure of paused transcription complex Pol II–DSIF–NELF // *Nature.* 2018. V. 560. № 7720. P. 601–606. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0442-2>
10. *Pei Y., Shuman S.* Interactions between fission yeast mRNA capping enzymes and elongation factor Spt5 // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 22. P. 19639–19648. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200015200>
11. *Yamada T., Yamaguchi Y., Inukai N. et al.* P-TEFb-mediated phosphorylation of hSpt5 C-terminal repeats is critical for processive transcription elongation // *Mol. Cell.* 2006. V. 21. № 2. P. 227–237. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.11.024>
12. *Vos S.M., Farnung L., Boehning M. et al.* Structure of activated transcription complex Pol II–DSIF–PAF–SPT6 // *Nature.* 2018. V. 560. № 7720. P. 607–612. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0440-4>
13. *Fitz J., Neumann T., Pavri R.* Regulation of RNA polymerase II processivity by Spt5 is restricted to a narrow window during elongation // *EMBO J.* 2018. V. 37. № 8. P. e97965. <https://doi.org/10.15252/embj.201797965>
14. *Maudlin I.E., Beggs J.D.* Spt5 modulates cotranscriptional spliceosome assembly in *Saccharomyces cerevisiae* // *RNA.* 2019. V. 25. № 10. P. 1298–1310. <https://doi.org/10.1261/rna.070425.119>
15. *Shetty A., Kallgren S.P., Demel C. et al.* Spt5 Plays vital roles in the control of sense and antisense transcription elongation // *Mol. Cell.* 2017. V. 66. № 1. P. 77–88.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.02.023>
16. *Jang M.K., Mochizuki K., Zhou M. et al.* The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription // *Mol. Cell.* 2005. V. 19. № 4. P. 523–534. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.06.027>
17. *Winter G.E., Mayer A., Buckley D.L. et al.* BET bromodomain proteins function as master transcription elongation factors independent of CDK9 recruitment // *Mol. Cell.* 2017. V. 67. № 1. P. 5–18.e19. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.06.004>
18. *Andrews F.H., Singh A.R., Joshi S. et al.* Dual-activity PI3K–BRD4 inhibitor for the orthogonal inhibition of MYC to block tumor growth and metastasis // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2017. V. 114. № 7. P. E1072–E1080. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613091114>
19. *Coudé M.-M., Braun T., Berrou J. et al.* BET inhibitor OTX015 targets BRD2 and BRD4 and decreases c-MYC in acute leukemia cells // *Oncotarget.* 2015. V. 6. № 19. P. 17698–17712.
20. *Chen F.X., Smith E.R., Shilatifard A.* Born to run: Control of transcription elongation by RNA polymerase II // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018. V. 19. № 7. P. 464–478. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0010-5>
21. *Lin C., Smith E.R., Takahashi H. et al.* AFF4, A component of the ELL/P-TEFb elongation complex and a shared subunit of MLL chimeras, can link transcription elongation to leukemia // *Mol. Cell.* 2010. V. 37. № 3. P. 429–437. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.026>
22. *Luo Z., Lin C., Shilatifard A.* The super elongation complex (SEC) family in transcriptional control // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012. V. 13. № 9. P. 543–547. <https://doi.org/10.1038/nrm3417>
23. *Nguyen V.T., Kiss T., Michels A.A., Bensaude O.* 7SK small nuclear RNA binds to and inhibits the activity of CDK9/cyclin T complexes // *Nature.* 2001. V. 414. № 6861. P. 322–325. <https://doi.org/10.1038/35104581>
24. *McNamara R.P., Reeder J.E., McMillan E.A. et al.* KAP1 recruitment of the 7SK snRNP complex to promoters enables transcription elongation by RNA polymerase II // *Mol Cell.* 2016. V. 61. № 1. P. 39–53. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.11.004>
25. *Bacon C.W., D’Orso I.* CDK9: A signaling hub for transcriptional control // *Transcription.* 2019. V. 10. № 2. P. 57–75. <https://doi.org/10.1080/21541264.2018.1523668>
26. *Parua P.K., Booth G.T., Sansó M. et al.* Cdk9–PP1 switch regulates the elongation–termination transition

- of RNA polymerase II // *Nature*. 2018. V. 558. № 7710. P. 460–464.
<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0214-z>
27. *Saldi T., Fong N., Bentley D.L.* Transcription elongation rate affects nascent histone pre-mRNA folding and 3' end processing // *Genes Dev*. 2018. V. 32. № 3–4. P. 297–308.
<https://doi.org/10.1101/gad.310896.117>
 28. *Ip J.Y., Schmidt D., Pan Q. et al.* Global impact of RNA polymerase II elongation inhibition on alternative splicing regulation // *Genome Res*. 2011. V. 21. № 3. P. 390–401.
<https://doi.org/10.1101/gr.111070.110>
 29. *Fong N., Kim H., Zhou Yu. et al.* Pre-mRNA splicing is facilitated by an optimal RNA polymerase II elongation rate // *Genes Dev*. 2014. V. 28. № 23. P. 2663–2676.
<https://doi.org/10.1101/gad.252106.114>
 30. *Aslanzadeh V., Huang Y., Sanguinetti G., Beggs J.D.* Transcription rate strongly affects splicing fidelity and cotranscriptionality in budding yeast // *Genome Res*. 2018. V. 28. № 2. P. 203–213.
<https://doi.org/10.1101/gr.225615.117>
 31. *Harlen K.M., Churchman L.S.* The code and beyond: Transcription regulation by the RNA polymerase II carboxy-terminal domain // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2017. V. 18. № 4. P. 263–273.
<https://doi.org/10.1038/nrm.2017.10>
 32. *Ebmeier C.C., Erickson B., Allen B.L. et al.* Human TFIIH kinase CDK7 regulates transcription-associated chromatin modifications // *Cell Rep*. 2017. V. 20. № 5. P. 1173–1186.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.07.021>
 33. *Krasnov A.N., Mazina M.Y., Nikolenko J.V., Vorobyeva N.E.* On the way of revealing coactivator complexes cross-talk during transcriptional activation // *Cell Biosci*. 2016. V. 6. P. 15.
<https://doi.org/10.1186/s13578-016-0081-y>
 34. *Guo Y.E., Manteiga J.C., Henninger J.E. et al.* Pol II phosphorylation regulates a switch between transcriptional and splicing condensates // *Nature*. 2019. V. 572. № 7770. P. 543–548.
<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1464-0>
 35. *Petes S.J., Lis J.T.* Rapid, transcription-independent loss of nucleosomes over a large chromatin domain at Hsp70 loci // *Cell*. 2008. V. 134. № 1. P. 74–84.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.029>
 36. *Petes S.J., Lis J.T.* Activator-induced spread of Poly(ADP-Ribose) polymerase promotes nucleosome loss at Hsp70 // *Mol. Cell*. 2012. V. 45. № 1. P. 64–74.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.11.015>
 37. *Smolle M., Workman J.L.* Transcription-associated histone modifications and cryptic transcription // *Biochim. Biophys. Acta BBA—Gene Regul. Mech*. 2013. V. 1829. № 1. P. 84–97.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.08.008>
 38. *Cheung V., Chua G., Batada N.N. et al.* Chromatin- and transcription-related factors repress transcription from within coding regions throughout the *Saccharomyces cerevisiae* genome // *PLoS Biol*. 2008. V. 6. № 11. e277.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060277>
 39. *Chang H.-W., Nizovtseva E.V., Razin S.V. et al.* Histone chaperone FACT and curaxins: Effects on genome structure and function // *J. Cancer Metastasis Treat*. 2019. V. 5.
<https://doi.org/10.20517/2394-4722.2019.31>
 40. *Pathak R., Singh P., Ananthkrishnan S. et al.* Acetylation-dependent recruitment of the FACT complex and Its role in regulating Pol II occupancy genome-wide in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genetics*. 2018. V. 209. № 3. P. 743–756.
<https://doi.org/10.1534/genetics.118.300943>
 41. *Sun M., Larivière L., Dengl S. et al.* A tandem SH2 domain in transcription elongation factor Spt6 binds the phosphorylated RNA polymerase II C-terminal Repeat Domain (CTD) // *J. Biol. Chem*. 2010. V. 285. № 53. P. 41597–41603.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.144568>
 42. *Schwabish M.A., Struhl K.* Asf1 mediates histone eviction and deposition during elongation by RNA polymerase II // *Mol. Cell*. 2006. V. 22. № 3. P. 415–422.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.03.014>
 43. *Silva A.C., Xu X., Kim H.-S. et al.* The replication-independent histone H3–H4 chaperones HIR, ASF1, and RTT106 Co-operate to maintain promoter fidelity // *J. Biol. Chem*. 2012. V. 287. № 3. P. 1709–1718.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.316489>
 44. *Govind C.K., Qiu H., Ginsburg D.S. et al.* Phosphorylated Pol II CTD recruits multiple HDACs, including Rpd3C(S), for methylation-dependent deacetylation of ORF nucleosomes // *Mol. Cell*. 2010. V. 39. № 2. P. 234–246.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.07.003>
 45. *Venkatesh S., Smolle M., Li H. et al.* Set2 methylation of histone H3 lysine 36 suppresses histone exchange on transcribed genes // *Nature*. 2012. V. 489. № 7416. P. 452–455.
<https://doi.org/10.1038/nature11326>
 46. *Batta K., Zhang Z., Yen K. et al.* Genome-wide function of H2B ubiquitylation in promoter and genic regions // *Genes Dev*. 2011. V. 25. № 21. P. 2254–2265.
<https://doi.org/10.1101/gad.177238.111>
 47. *Lee J.-S., Garrett A.S., Yen K. et al.* Codependency of H2B monoubiquitination and nucleosome reassembly on Chd1 // *Genes Dev*. 2012. V. 26. № 9. P. 914–919.
<https://doi.org/10.1101/gad.186841.112>
 48. *Van Oss S.B., Shirra M.K., Bataille A.R. et al.* The histone modification domain of Paf1 complex subunit Rtf1 directly stimulates H2B ubiquitylation through an interaction with Rad6 // *Mol. Cell*. 2016. V. 64. № 4. P. 815–825.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.10.008>
 49. *Imashimizu M., Takahashi H., Oshima T.* Visualizing translocation dynamics and nascent transcript errors in paused RNA polymerases *in vivo* // *Genome Biol*. 2015. V. 16. № 1. P. 98.
<https://doi.org/10.1186/s13059-015-0666-5>
 50. *Bush M., Dixon R.* The role of bacterial enhancer binding proteins as specialized activators of σ^{54} -dependent transcription // *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 2012. V. 76. № 3. P. 497–529.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00006-12>

51. *Cournac A., Plumbridge J.* DNA looping in prokaryotes: Experimental and theoretical approaches // *J. Bacteriol.* 2013. V. 195. № 6. P. 1109–1119. <https://doi.org/10.1128/JB.02038-12>
52. *Kyrchanova O., Georgiev P.* Chromatin insulators and long-distance interactions in *Drosophila* // *FEBS Lett.* 2014. V. 588. № 1. P. 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.10.039>
53. *Schwartz Y.B., Cavalli G.* Three-dimensional genome organization and function in *Drosophila* // *Genetics.* 2017. V. 205. № 1. P. 5–24. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.185132>
54. *Dixon J.R., Selvaraj S., Yue F. et al.* Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions // *Nature.* 2012. V. 485. № 7398. P. 376–380. <https://doi.org/10.1038/nature11082>
55. *Fishman V., Battulin N., Nuriddinov M. et al.* 3D organization of chicken genome demonstrates evolutionary conservation of topologically associated domains and highlights unique architecture of erythrocytes' chromatin // *Nucl. Acids Res.* 2019. V. 47. № 2. P. 648–665. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1103>
56. *Noordermeer D., Leleu M., Schorderet P. et al.* Temporal dynamics and developmental memory of 3D chromatin architecture at Hox gene loci // *eLife.* 2014. V. 3. P. e02557. <https://doi.org/10.7554/eLife.02557>
57. *Narendra V., Rocha P.P., An D. et al.* CTCF establishes discrete functional chromatin domains at the Hox clusters during differentiation // *Science.* 2015. V. 347. № 6225. P. 1017–1021. <https://doi.org/10.1126/science.1262088>
58. *Tsujimura T., Klein F.A., Langenfeld K. et al.* A discrete transition zone organizes the topological and regulatory autonomy of the adjacent *tfap2c* and *bmp7* genes // *PLoS Genet.* 2015. V. 11. № 1. P. e1004897. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004897>
59. *Szabo Q., Bantignies F., Cavalli G.* Principles of genome folding into topologically associating domains // *Sci. Adv.* 2019. V. 5. № 4. P. eaaw1668. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw1668>
60. *Fudenberg G., Imakaev M., Lu C. et al.* Formation of chromosomal domains by loop extrusion // *Cell Rep.* 2016. V. 15. № 9. P. 2038–2049. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.085>
61. *Sanborn A.L., Rao S.S.P., Huang S.-C. et al.* Chromatin extrusion explains key features of loop and domain formation in wild-type and engineered genomes // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. № 47. P. E6456–E6465. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518552112>
62. *Ulianov S.V., Khrameeva E.E., Gavrilov A.A. et al.* Active chromatin and transcription play a key role in chromosome partitioning into topologically associating domains // *Genome Res.* 2016. V. 26. № 1. P. 70–84. <https://doi.org/10.1101/gr.196006.115>
63. *Hug C.B., Grimaldi A.G., Kruse K., Vaquerizas J.M.* Chromatin architecture emerges during zygotic genome activation independent of transcription // *Cell.* 2017. V. 169. № 2. P. 216–228. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.024>
64. *Du Z., Zheng H., Huang B. et al.* Allelic reprogramming of 3D chromatin architecture during early mammalian development // *Nature.* 2017. V. 547. № 7662. P. 232–235. <https://doi.org/10.1038/nature23263>
65. *Ke Y., Xu Y., Chen X. et al.* 3D Chromatin structures of mature gametes and structural reprogramming during mammalian embryogenesis // *Cell.* 2017. V. 170. № 2. P. 367–381. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.029>
66. *Mazina M.Y., Ziganshin R.H., Magnitov M.D. et al.* Proximity-dependent biotin labelling reveals CP190 as an EcR/Usp molecular partner // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. P. 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61514-0>
67. *Воробьева Н.Е., Мазина М.Ю.* Функции инсульторов в контексте современных полногеномных исследований // *Генетика.* 2019. Т. 55. №2. С. 154–162.
68. *Maksimenko O., Georgiev P.* Mechanisms and proteins involved in long-distance interactions // *Front. Genet.* 2014. V. 5. P. 28. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00028>
69. *Ghirlando R., Felsenfeld G.* CTCF: Making the right connections // *Genes Dev.* 2016. V. 30. № 8. P. 881–891. <https://doi.org/10.1101/gad.277863.116>
70. *Gambetta M.C., Furlong E.E.M.* The insulator protein CTCF is required for correct hox gene expression, but not for embryonic development in *Drosophila* // *Genetics.* 2018. V. 210. № 1. P. 129–136. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.301350>
71. *Wang Q., Sun Q., Czajkowsky D.M., Shao Z.* Sub-kb Hi-C in *D. melanogaster* reveals conserved characteristics of TADs between insect and mammalian cells // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 188. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02526-9>
72. *Schwartz Y.B., Linder-Basso D., Kharchenko P.V. et al.* Nature and function of insulator protein binding sites in the *Drosophila* genome // *Genome Res.* 2012. V. 22. № 11. P. 2188–2198. <https://doi.org/10.1101/gr.138156.112>
73. *Wood A.M., Van Bortle K., Ramos E. et al.* Regulation of chromatin organization and inducible gene expression by a *Drosophila* insulator // *Mol. Cell.* 2011. V. 44. № 1. P. 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.07.035>
74. *Furlong E.E.M., Levine M.* Developmental enhancers and chromosome topology // *Science.* 2018. V. 361. № 6409. P. 1341–1345. <https://doi.org/10.1126/science.aau0320>
75. *Deng W., Lee J., Wang H. et al.* Controlling long-range genomic interactions at a native locus by targeted tethering of a looping factor // *Cell.* 2012. V. 149. № 6. P. 1233–1244. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.051>

76. *Krivega I., Dean A.* LDB1-mediated enhancer looping can be established independent of mediator and cohesin // *Nucleic Acids Res.* 2017. V. 45. № 14. P. 8255–8268.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx433>
77. *Pascual-García P., Debo B., Aleman J.R. et al.* Metazoan nuclear pores provide a scaffold for poised genes and mediate induced enhancer-promoter contacts // *Mol. Cell.* 2017. V. 66. № 1. P. 63–76.e6.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.02.020>
78. *Rubin A.J., Barajas B.C., Furlan-Magaril M. et al.* Lineage-specific dynamic and pre-established enhancer-promoter contacts cooperate in terminal differentiation // *Nat. Genet.* 2017. V. 49. № 10. P. 1522–1528.
<https://doi.org/10.1038/ng.3935>
79. *Ghavi-Helm Y., Klein F.A., Pakozdi T. et al.* Enhancer loops appear stable during development and are associated with paused polymerase // *Nature.* 2014. V. 512. № 7512. P. 96–100.
<https://doi.org/10.1038/nature13417>
80. *Allen B.L., Taatjes D.J.* The mediator complex: A central integrator of transcription // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2015. V. 16. № 3. P. 155–166.
<https://doi.org/10.1038/nrm3951>
81. *Soutourina J.* Transcription regulation by the Mediator complex // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018. V. 19. № 4. P. 262–274.
<https://doi.org/10.1038/nrm.2017.115>
82. *Kagey M.H., Newman J.J., Bilodeau S. et al.* Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture // *Nature.* 2010. V. 467. № 7314. P. 430–435.
<https://doi.org/10.1038/nature09380>
83. *Phillips-Cremins J.E., Sauria M.E.G., Sanyal A. et al.* Architectural protein subclasses shape 3D organization of genomes during lineage commitment // *Cell.* 2013. V. 153. № 6. P. 1281–1295.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.053>
84. *El Khattabi L., Zhao H., Kalchschmidt J. et al.* A pliable Mediator acts as a functional rather than an architectural bridge between promoters and enhancers // *Cell.* 2019. V. 178. № 5. P. 1145–1158.e20.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.07.011>
85. *Hnisz D., Shrinivas K., Young R.A. et al.* A phase separation model for transcriptional control // *Cell.* 2017. V. 169. № 1. P. 13–23.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.007>
86. *Meier U.T.* RNA modification in Cajal bodies // *RNA Biol.* 2017. V. 14. № 6. P. 693–700.
<https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1249091>
87. *Kantidze O.L., Razin S.V.* Weak interactions in higher-order chromatin organization // *Nucl. Acids Res.* 2020. V. 48. № 9. P. 4614–4626.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa261>
88. *Bonchuk A., Denisov S., Georgiev P., Maksimenko O.* Drosophila BTB/POZ domains of “ttk Group” can form multimers and selectively interact with each other // *J. Mol. Biol.* 2011. V. 412. № 3. P. 423–436.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.07.052>
89. *Dorsett D.* The many roles of cohesin in Drosophila gene transcription // *Trends Genet. TIG.* 2019. V. 35. № 7. P. 542–551.
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2019.04.002>
90. *Wang Q., Carroll J.S., Brown M.* Spatial and temporal recruitment of androgen receptor and its coactivators involves chromosomal looping and polymerase tracking // *Mol. Cell.* 2005. V. 19. № 5. P. 631–642.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.07.018>
91. *Mandal S.S., Chu C., Wada T. et al.* Functional interactions of RNA-capping enzyme with factors that positively and negatively regulate promoter escape by RNA polymerase II // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. № 20. P. 7572–7577.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0401493101>
92. *Chen F.X., Woodfin A.R., Gardini A. et al.* PAF1, A molecular regulator of promoter-proximal pausing by RNA polymerase II // *Cell.* 2015. V. 162. № 5. P. 1003–1015.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.042>
93. *Chen Y., Yamaguchi Y., Tsugeno Y. et al.* DSIF, the Paf1 complex, and Tat-SF1 have nonredundant, cooperative roles in RNA polymerase II elongation // *Genes Dev.* 2009. V. 23. № 23. P. 2765–2777.
<https://doi.org/10.1101/gad.1834709>
94. *Elrod N.D., Henriques T., Huang K.-L. et al.* The integrator complex attenuates promoter-proximal transcription at protein-coding genes // *Mol. Cell.* 2019. V. 76. № 5. P. 738–752.e7.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.10.034>
95. *Rienzo M., Casamassimi A.* Integrator complex and transcription regulation: Recent findings and pathophysiology // *Biochim. Biophys. Acta.* 2016. V. 1859. № 10. P. 1269–1280.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.07.008>
96. *Baillat D., Hakimi M.-A., Näär A.M. et al.* Integrator, a multiprotein mediator of small nuclear RNA processing, associates with the C-terminal repeat of RNA polymerase II // *Cell.* 2005. V. 123. № 2. P. 265–276.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.019>
97. *Pavri R., Zhu B., Li G. et al.* Histone H2B monoubiquitination functions cooperatively with FACT to regulate elongation by RNA polymerase II // *Cell.* 2006. V. 125. № 4. P. 703–717.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.04.029>
98. *Kwon S.H., Florens L., Swanson S.K. et al.* Heterochromatin protein 1 (HP1) connects the FACT histone chaperone complex to the phosphorylated CTD of RNA polymerase II // *Genes Dev.* 2010. V. 24. № 19. P. 2133–2145.
<https://doi.org/10.1101/gad.1959110>
99. *Splinter E., Heath H., Kooren J. et al.* CTCF mediates long-range chromatin looping and local histone modification in the beta-globin locus // *Genes Dev.* 2006. V. 20. № 17. P. 2349–2354.
<https://doi.org/10.1101/gad.399506>
100. *Tang Z., Luo O.J., Li X. et al.* CTCF-mediated human 3D genome architecture reveals chromatin topology for transcription // *Cell.* 2015. V. 163. № 7. P. 1611–1627.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.024>
101. *Kim T.H., Abdullaev Z.K., Smith A.D. et al.* Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF-binding sites in the human genome // *Cell.* 2007. V. 128. № 6. P. 1231–1245.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.12.048>
102. *Shrestha S., Oh D.-H., McKowen J.K. et al.* 4C-seq characterization of Drosophila BEAF binding regions

- provides evidence for highly variable long-distance interactions between active chromatin // *PLoS One*. 2018. V. 13. № 9. P. e0203843. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203843>
103. *Maksimenko O., Bartkuhn M., Stakhov V. et al.* Two new insulator proteins, Pita and ZIPIC, target CP190 to chromatin // *Genome Res*. 2015. V. 25. № 1. P. 89–99. <https://doi.org/10.1101/gr.174169.114>
104. *Zolotarev N., Maksimenko O., Kyrchanova O. et al.* Opbp is a new architectural/insulator protein required for ribosomal gene expression // *Nucl. Acids Res*. 2017. V. 45. № 21. P. 12285–12300. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx840>

Regulators of Elongation and Architectural Proteins as New Participants of Eukaryotic Gene Transcription

N. E. Vorobyeva^a and M. Yu. Mazina^{a, *}

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

**e-mail: mazinam@genebiology.ru*

Until recently, the main proteins-coregulators of transcription were considered to be complexes that change the chromatin structure, such as remodelers and histone modifiers. However, the latest studies of the mechanisms of regulation of transcription have made it possible to refine this classification. Two additional classes of transcriptional coregulators have been identified: elongation regulators and proteins/protein complexes that alter the three-dimensional structure of chromatin. In this review, we summarized the most recent information on the possibilities of regulating the transcription of eukaryotic genes via influence on elongation and three-dimensional structure of chromatin. We discuss such issues as regulation of RNA polymerase II “pause” and transcription elongation rate, suppression of cryptic transcription in the gene body, as well as the role of proteins/protein complexes in the formation of separate topological domains and providing communication between enhancers and promoters.

Keywords: transcription, chromatin, enhancer, coregulator, elongation of transcription, architectural proteins.

ОБЗОРНЫЕ
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 577.21

МикроРНК КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ БИОМАРКЕРЫ
САХАРНОГО ДИАБЕТА 2-го ТИПА

© 2021 г. З. Н. Тонян^{1, *}, Ю. А. Насыхова^{1,2}, А. А. Михайлова^{1,2}, А. С. Глозов^{1,2}

¹Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии
им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, 199034 Россия

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

*e-mail: ziravard@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.08.2020 г.

После доработки 01.10.2020 г.

Принята к публикации 08.10.2020 г.

МикроРНК – малые некодирующие РНК, участвующие в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов. В последние годы были опубликованы работы, демонстрирующие изменение профиля микроРНК в тканях при сахарном диабете 2-го типа. В настоящей работе проведен систематический обзор результатов 91 исследования, опубликованных с ноября 2009 г. по июнь 2020 г. Рассматриваются перспективы использования miR-29a, -34a, -126, -144, -375 в качестве потенциальных биомаркеров сахарного диабета 2-го типа, а также обсуждаются возможные гены-мишени этих микроРНК и механизмы участия в метаболизме глюкозы.

Ключевые слова: микроРНК, сахарный диабет 2-го типа, биомаркер.

DOI: 10.31857/S0016675821060102

Сахарный диабет 2-го типа (СД2) – распространенное заболевание, характеризующееся хронической гипергликемией и сопровождающееся повреждением и дисфункцией почек, нервов, сердца, кровеносных сосудов и других органов. По данным Всемирной организации здравоохранения сегодня в мире насчитывается более 400 миллионов лиц с СД2, и их число неуклонно растет с каждым годом [1]. Повсеместная распространенность данного заболевания, а также широкий спектр вызываемых им осложнений делают своевременную диагностику СД2 одной из актуальных проблем современной медицины. Новые ранние диагностические маркеры, способные охарактеризовать предрасположенность человека к СД2, позволяют более точно сформировать группу риска возникновения СД2, дать пациенту своевременные рекомендации для предупреждения развития заболевания в будущем, предотвратить появление осложнений и потерю трудоспособности. Одним из потенциальных подходов к ранней диагностике СД2 является оценка изменяющейся в тканях экспрессии малых некодирующих РНК (микроРНК, miR) [2].

микроРНК является синтез РНК-полимеразой II или III транскрипта при-микроРНК, обладающего двуцепочечной шпилечной структурой (рис. 1). Далее при-микроРНК распознаются ядерными белками Drosha и DGCR8 (Pasha, DiGeorge Syndrome critical region 8) и разрезаются у основания шпилечной структуры с формированием свободного 3'-конца из двух нуклеотидов. Образовавшаяся пре-микроРНК экспортируется из ядра в цитоплазму при помощи белка-переносчика exportin-5. В цитоплазме белок Dicer вырезает из шпилечной структуры петлю, в результате чего образуется дуплекс микроРНК. Одна из цепей (“пассажирская”) расщепляется белком AGO2, вторая (“направляющая”) связывается с белками семейства Argonaute (AGO1–4) с образованием микроРНК-индуцируемого сайленсинг-комплекса (miRNA-induced silencing complex, miRISC). Основной функцией этого комплекса является посттранскрипционная регуляция трансляции генов-мишеней. При полной комплементарности микроРНК мРНК гена-мишени последняя деградирует под действием РНКазы AGO2 [4].

СТРУКТУРА И БИОГЕНЕЗ микроРНК

Длина микроРНК составляет в среднем от 19 до 25 нуклеотидов [3]. Первым этапом в биогенезе

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ
МИКРОРНК ПРИ СД2

Множество работ, посвященных изменению профиля микроРНК при СД2 в тканях и биологи-

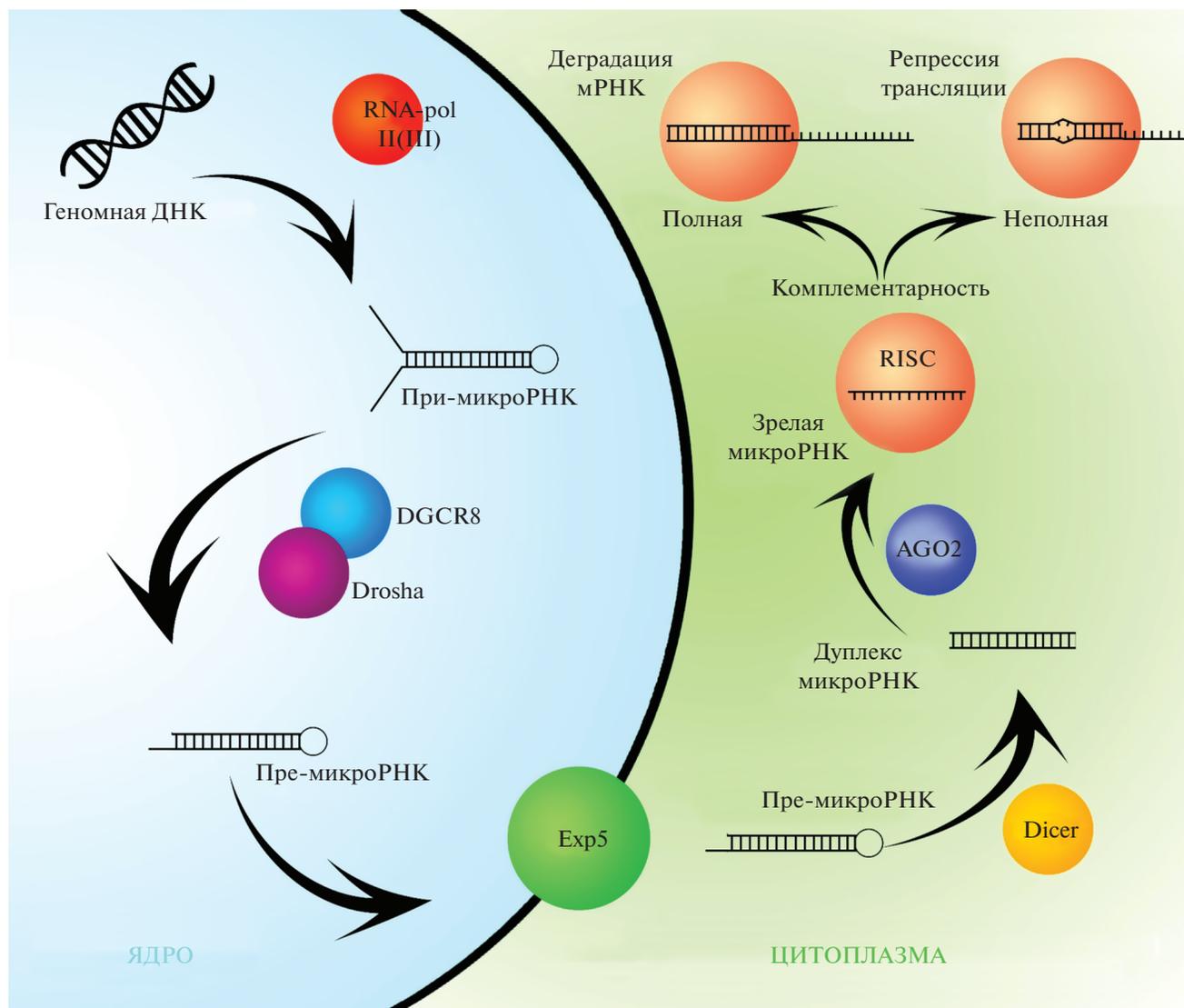


Рис. 1. Схема биогенеза микроРНК. RNA-pol II(III) – РНК-полимераза II (III), DGCR8 – ядерный белок Pasha, DiGeorge Syndrome critical region 8, Exp5 – белок-переносчик exportin 5 (экспортин 5), AGO2 – Argonaute 2 (РНКаза), RISC – микроРНК-индуцируемый сайленсинг комплекс.

ческих жидкостях, а также поиску генов-мишеней этих микроРНК, было проведено с 2009 г. [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>]. На эту тему также издан систематический обзор результатов исследований, проведенных с ноября 2009 по ноябрь 2016 г. [5]. В настоящем обзоре суммированы результаты 88 работ, опубликованных с ноября 2009 по июнь 2020 г. в разных странах. В табл. 2 (см. в конце статьи) обобщены сведения, включающие выявленные микроРНК, тип биоматериала, в котором они были детектированы, а также методы их обнаружения и измерения уровня экспрессии. В настоящее время исследователями выявлено более 250 микроРНК, профиль которых изменен у пациентов с СД2 по сравнению с контрольной группой в цельной крови,

плазме, сыворотке, агранулоцитах, клетках островков поджелудочной железы и поперечнополосатой мускулатуре.

В настоящем обзоре рассмотрены функции наиболее изученных микроРНК, ассоциированных с СД2 по результатам более четырех подтвержденных исследований. Важно отметить, что на сегодняшний день не было проведено исследований, посвященных анализу уровня экспрессии микроРНК у пациентов с диагностированным СД2 в российской популяции.

miR-375

miR-375 является одной из наиболее изученных микроРНК у пациентов с СД2. Она высоко

экспрессирована в клетках островков поджелудочной железы [6, 7], а также детектируется в цельной крови [8], плазме [9, 10] и сыворотке [11–13]. Известно, что miR-375 играет важную роль в формировании инсулин-секретирующих клеток [14]. Экспрессия miR-375 регулируется транскрипционными факторами *PDX1* и *NEUROD1*, ответственными за созревание β -клеток и экспрессию гена инсулина соответственно [15]. Повышенный уровень miR-375 угнетает индуцируемую глюкозой секрецию инсулина путем подавления экзоцитоза. Это может объясняться тем, что мишенью для этой miR-375 является *MTPN* – ген белка миотрофина, ответственного за везикулярный транспорт и экзоцитоз [6]. Помимо транспортной функции миотрофин выполняет защитную функцию, предохраняя β -клетки от индуцируемого свободными жирными кислотами апоптоза [16]. Значимость miR-375 в метаболизме глюкозы также подтверждена в исследовании на крысах, в котором было продемонстрировано изменение экспрессии miR-375, регулирующей пролиферацию β -клеток [17], под действием внешних факторов, влияющих на плод на ранних этапах развития.

Интересно, что мишенью miR-375 также может быть ген *SLC2A8*, кодирующий глюкозный транспортер 8 (GLUT8) [http://www.targetscan.org/vert_72/, 18]. Точные функции GLUT8 на сегодня неясны, однако существуют сведения о локализации этого белка как в инсулиннезависимых нейронах, так и в инсулинзависимых кардиомиоцитах и скелетной мускулатуре [19]. Перечисленные особенности miR-375 делают ее как многообещающим диагностическим маркером, так и возможной мишенью для терапии СД2.

miR-126

Еще одной перспективной для дальнейшего изучения микроРНК представляется miR-126, высоко экспрессированная в клетках эндотелия сосудов [20, 21]. Считается, что основной функцией miR-126 является подавление активности репрессоров фактора роста эндотелия сосудов VEGF [22]. Так показано, что “пассажирская” цепь miR-126-5p поддерживает пролиферативный резерв клеток эндотелия путем подавления гена-мишени *DLK1* [23], продукт которого является ингибитором ангиогенеза [24], в связи с чем восстановление поврежденной сосудистой стенки и рост сосудов могут быть замедлены при сниженном уровне miR-126.

Исследователями было выявлено, что у лиц с СД2 (по сравнению с контрольной группой) понижен уровень экспрессии miR-126 в агранулоцитах [25] и в поперечнополосатой мускулатуре [26]. Снижение количества циркулирующей микроРНК также наблюдалось в цельной крови [27], плазме [28–32] и сыворотке [33, 34] больных.

Важно отметить, что измененный профиль miRNA-126 отмечался у представителей разных популяций: азиатской [25, 31, 33], европейской [26, 28–30], а также у жителей Среднего Востока [27, 32, 34], что демонстрирует универсальность miR-126 как потенциального биомаркера для диагностики СД2 в перспективе. Однако нельзя не учитывать его неспецифичность: исследователями выявлено снижение экспрессии miR-126 при псориазе [35], новообразованиях желудочно-кишечного, урогенитального трактов, щитовидной, молочной желез, легких и других локализаций [36, 37]. Отчасти, это объясняется участием miR-126 в подавлении трансляции протоонкогенов *KRAS* и *CRK* [36].

В то же время, уровень miR-126 повышен при ишемической болезни сердца [38, 39], пролиферативной диабетической ретинопатии [40], эндометриозе [41], а также при приеме аторвастатина [42]. Таким образом, ввиду низкой специфичности, вопрос возможности использования miR-126 как раннего маркера для диагностики СД2 остается открытым.

miR-34a

miR-34a транскрибируется с локуса 1p36 [43]. Известно, что экспрессия miR-34a находится в прямой зависимости от уровня антионкогена p53 [44]. Это объясняется тем, что miR-34a содержит палиндромную последовательность нуклеотидов, совпадающую с канонической последовательностью сайтов связывания белка p53 [45]. Показано, что miR-34a участвует в регуляции клеточного цикла, процессов репарации ДНК и стресс-индуцированного апоптоза посредством воздействия на таргетные гены *CCNE2*, *CDK6* и *E2F5* [43]. Р. Lovis с соавт. продемонстрировали увеличение экспрессии p53 и miR-34a в клетках островков поджелудочной железы мышей, что может служить дополнительным механизмом индукции апоптоза в β -клетках, подвергавшихся липотоксическому воздействию свободных жирных кислот [46]. В ряде работ было показано, что у лиц с СД2 уровень miR-34a повышен в сыворотке [11, 47, 48], плазме [49–51] и в агранулоцитах [52].

miR-144

miR-144 также играет важную роль в патогенезе СД2, так как одним из генов-мишеней для нее является ген *IRS1*, кодирующий субстрат 1 инсулинового рецептора [53]. Продукт этого гена выступает посредником между рецепторами инсулина, инсулиноподобного фактора роста 1 и элементами внутриклеточного сигнального пути PI3K/AKT [54]. Известно, что этот сигнальный путь задействован в перемещении инсулинзависимого транспортера глюкозы 4 (GLUT4) из цитоплазмы в плаз-

матическую мембрану, поэтому при повышенном уровне miR-144 нарушается захват глюкозы адипоцитами — клетками скелетной мускулатуры и миокарда [55].

Еще одной функцией miR-144 является участие в адипогенезе. Было показано, что повышение экспрессии miR-144 ингибирует пролиферацию преадипоцитов, способствует их дифференцировке, снижает интенсивность синтеза жирных кислот и стимулирует их окисление путем воздействия на целевые гены *KLF3* и *CTBP2* [56]. Исследователями было детектировано изменение профиля miR-144 в сыворотке [57], плазме [50, 58–60], поперечнополосатой мускулатуре [26], агранулоцитах [61] и цельной крови [8] у пациентов с СД2. Учитывая широкую распространенность метаболического синдрома, частота которого варьирует от 20 до 35% у населения России [62], дальнейшее изучение miR-144 как потенциального биомаркера и терапевтической мишени для диагностики и терапии ожирения и СД2 представляется особенно интересным. В то же время существуют исследования, свидетельствующие о повышенной экспрессии miR-144 при ишемической болезни сердца [63], что значительно снижает специфичность miR-144 как биомаркера.

miR-29a

miR-29a транскрибируется с локуса 7q32.3 и детектируется во всех инсулин-зависимых органах и тканях человека [64], а также в плазме [60], сыворотке [11, 12] и цельной крови [8]. Было выявлено, что длительное воздействие насыщенных жирных кислот стимулирует экспрессию miR-29a в миоцитах. miR-29a, в свою очередь, подавляет трансляцию гена-мишени *IRS1*, воздействуя на 3'-нетранслируемую область, и, таким образом, препятствует активации внутриклеточных механизмов, способствующих поглощению глюкозы клеткой [65]. Таким образом, результаты исследований показали, что использование miR-29a как потенциального диагностического биомаркера представляется перспективным.

Следует подчеркнуть, что современные исследования дифференциальной экспрессии циркулирующих РНК при различных заболеваниях направлены преимущественно на оценку профиля экспрессии отдельных микроРНК, ассоциированных с патологией. Однако для понимания патогенеза заболеваний несомненный интерес представляет изучение механизмов совместного действия нескольких микроРНК, которые могут либо усиливать эффект каждой из них, либо выступать в роли антагонистов. В особенности это важно, если микроРНК вовлечены в одни и те же метаболические пути и/или ответственны за подавление трансляции одних и тех же генов. Так, дважды была продемонстрирована одновременная повы-

шенная экспрессия описанных выше miR-29a и miR-375 [11, 12] в сыворотке крови, а также miR-29a и miR-144 [53, 60] в цельной крови и плазме. Любопытно, что последняя пара микроРНК обладает схожими механизмами участия в метаболизме глюкозы, так как геном-мишенью для miR-29a и miR-144 является *IRS1*.

ФУНКЦИИ микроРНК, АССОЦИИРОВАННЫХ С СД2, В РАЗНЫХ ТКАНЯХ

Центральным механизмом в патогенезе СД2 и метаболического синдрома является инсулинорезистентность периферических тканей. Чувствительность тканей к инсулину обусловлена его воздействием на специфические рецепторы на поверхности клеток, что способствует активации внутриклеточных каскадов, приводящих, в конечном итоге, к перемещению транспортера GLUT4 из цитоплазмы в плазматическую мембрану и поглощению глюкозы клеткой [66]. При нарушении активации инсулинового рецептора либо элементов внутриклеточных сигнальных путей, задействованных в переносе GLUT4, снижается способность инсулинозависимых миоцитов и адипоцитов поглощать глюкозу [67].

Наибольшее число микроРНК с измененной экспрессией было обнаружено исследователями в поперечнополосатой мускулатуре пациентов с СД2. Так, для нее характерна сниженная экспрессия miR-194, участвующей в метаболизме глюкозы посредством активации сигнального пути PI3K/АКТ в ответ на взаимодействие клетки с инсулином [68]. Помимо этого, была продемонстрирована обратная взаимосвязь между экспрессией miR-194 миоцитами и уровнем фосфорилирования киназы гликогенсинтазы GSK3 β , ответственной за гликолиз [68]. Также инсулин регулирует уровень экспрессии специфичных для мышечной ткани miR-1 и miR-133a [69].

В работе N. Klötting с соавт. были выявлены специфические для жировой ткани: miR-17-5p, miR-132, miR-134, miR-181a, miR-27a, miR-30e, miR-140, miR-147, miR-155, miR-197 и miR-210, ассоциированные с метаболизмом глюкозы при СД2 [70]. В частности влияние miR-132 на гомеостаз глюкозы объясняется регулированием экспрессии транскрипционного фактора *CREB* [70]. Известно, что *CREB* стимулирует глюконеогенез, опосредует действие глюкагона в ответ на увеличение внутриклеточной концентрации цАМФ и повышает экспрессию фактора ATF3, подавляющего трансляцию гена *SLC2A4*, ответственного за синтез транспортера глюкозы GLUT4 [71, 72]. Одной из мишеней синтезируемой в адипоцитах miR-100 является ген рецептора инсулиноподобного фактора роста *IGFR*, который при одновременной экспрессии с геном инсулинового рецептора *IR*

Таблица 1. Изменение уровня микроРНК в тканях и биологических жидкостях

микроРНК	ПК	СК	ЦК	КПЖ	ППМ	ЖТ	А
15a	↓	—	↓	—	↓	—	—
29a	↑	↑	↑	—	—	—	—
30d	↑	↑	↓	—	—	—	—
34a	↑	↑	—	—	—	—	↑
122	—	↑	—	—	—	—	—
126	↓	↓	↓	—	↓	—	↓
126-3p	↓	—	—	—	—	—	—
130a	—	—	↓	—	—	—	↓
144	↑	—	↑	—	↑	—	↑
150	↑	—	↑	—	—	—	—
187	—	—	—	↑	—	—	—
210	↑	—	↑	—	—	↓	—
223	↓	—	—	—	—	—	—
375	↑	↑	↑	↑	—	—	—
let-7f	↓	—	—	—	—	—	—

Примечание. ПК – плазма крови, СК – сыворотка крови, ЦК – цельная кровь, КПЖ – клетки островков поджелудочной железы, ППМ – поперечнополосатая мускулатура, ЖТ – жировая ткань, А – агранулоциты; в таблице перечислены микроРНК, ассоциированные с СД2 по результатам двух и более исследований; стрелками обозначено повышение (↑) либо понижение (↓) уровня экспрессии микроРНК в сравнении с контрольной группой.

способен формировать “гибридный” рецептор. Предполагается, что “гибридный” рецептор может обладать низким сродством с молекулой инсулина, что вносит вклад в развитие инсулинорезистентности при сниженной экспрессии miR-100, характерной для адипоцитов людей с СД2 [73].

Специфичные для β-клеток островков поджелудочной железы miR-7, miR-369, miR-487a, miR-655 и miR-656 транскрибируются с локуса 14q32. Выявлено, что у пациентов с СД2 их экспрессия значительно снижена по сравнению со здоровыми индивидами. Генами-мишенями этих микроРНК являются гены *IAPP* и *TP53INP1*, задействованные в апоптозе β-клеток [74]. Также для пациентов с СД2 характерна гиперэкспрессия miR-187 островковыми клетками поджелудочной железы. Было показано, что, подавляя трансляцию гена-мишени *HIPK3*, miR-187 угнетает индуцируемую глюкозой секрецию инсулина и пролиферацию β-клеток [75, 76]. В 2016 г. Х. Ноу с соавт. выявили целевой для miR-463-3p ген *ABCG4*, уровень экспрессии которого был обратно пропорционален таковому для miR-463-3p. Авторами было высказано предположение о возможном участии этого гена в индуцируемой глюкозой секреции инсулина, однако вопрос о механизме этого участия остается нерешенным [77].

Во многих исследованиях было проанализировано изменение профиля микроРНК в сыворотке и плазме крови. Так количество рассмотренных выше циркулирующих miR-29a, -34a, -126, -375

было изменено в сыворотке и плазме крови, miR-144 – в плазме (табл. 1).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день в мире проведено большое количество исследований, посвященных изменению уровня микроРНК, ассоциированного с СД2, а также выявлены циркулирующие микроРНК, детекция которых возможна в сыворотке и плазме крови, что делает их перспективными маркерами для ранней диагностики СД2 (табл. 2). Однако на изменение уровня микроРНК влияет множество внешних факторов, таких как особенности клинического течения заболевания, наличие осложнений (диабетической нефропатии, ретинопатии) [78] и сопутствующих заболеваний. Немаловажное значение имеет этническая принадлежность пациента [79]. К тому же, зачастую экспрессия той или иной микроРНК нарушается в одинаковой степени при нескольких патологических состояниях, что затрудняет использование микроРНК как специфического диагностического маркера. Но, одновременно с этим, открываются новые возможности для поиска у представителей российской популяции микроРНК со стабильно измененной экспрессией, не зависящей от внешних факторов. Исследование микроРНК является актуальной проблемой, решение которой позволит глубже понять молекулярные механизмы патогенеза СД2, что, несомненно, станет важным

Таблица 2. Результаты исследований, посвященных изучению экспрессии микроРНК при СД2

Источник	Повышенный уровень экспрессии микроРНК	Пониженный уровень экспрессии микроРНК	Метод исследования	Ткань	Страна
[70]	miR-147, -181a, -197	miR-17-5p, -27a, -30e, -132, -134, -140, -155, -210	Микрочипы	ЖТ	Германия
[80]	miR-125b, -199a-5p, -221, -1229	miR-30a, -130b, -484, -K12-7	Микрочипы + + ОТ-ПЦР РВ	ЖТ	Испания
[73]	–	miR-125b, -181a, -210, -378	Микрочипы + + ОТ-ПЦР РВ	ЖТ	Сингапур
[74]	miR-187, -224, -589	miR-7, -369, -487a, -655, -656	ОТ-ПЦР РВ	КПЖ	США
[75]	miR-187, -345	–	То же	КПЖ	США, Великобритания
[81]	miR-124a	–	»	КПЖ	Италия
[77]	miRNA-463-3p	–	»	КПЖ	Китай
[82]	–	miR-146a	»	А	Индия
[26]	–	miR-21, -27a, -27b, -126, -130a	Микрочипы + + ОТ-ПЦР РВ	А	Китай
[83]	–	miR-155, -146a	ОТ-ПЦР РВ	А	Мексика
[84]	miR-34c-5p, -576-3p	–	Микрочипы + + ОТ-ПЦР РВ	А	Германия, Эквадор
[85]	–	miR-146a	ОТ-ПЦР РВ	А	Италия
[86]	–	miR-155	То же	А	Иран
[87]	–	miR-223-3p	»	А	Китай
[88]	miR-18a	miR-34c	»	А	Китай
[53]	miR-34a , -125b	–	»	А	Китай
[89]	miR-21	–	»	А	Иран
[61]	miR-144-3p, 20a-5p, 188-3p	miR-548k	»	А	Франция
[90]	–	miR-181b, -126-5p	»	А	Испания
[28]	miR-28-3p	miR-20b, -21, -24, -15a, -126, -191, -197, -223, -320, -486	Микрочипы + + ОТ-ПЦР РВ	ПК	Италия
[91]	miRNA-146a	–	ОТ-ПЦР РВ	ПК	Китай
[92]	–	miR-223, -146a	То же	ПК	Китай
[9]	miR-375	–	»	ПК	Китай
[93]	miR-326	let-7a, -7f	Микрочипы + + ОТ-ПЦР РВ	ПК	Германия
[58]	miR-144 , -486-5p, -150	–	ОТ-ПЦР РВ	ПК	Швеция, Ирак
[10]	miR-375	–	То же	ПК	Китай
[94]	miR-199	–	»	ПК	Китай
[29]	miR-140-5p, -142-3p, -222	miR-423-5p, -125b, -192, -195, -130b, -532-5p, -126	»	ПК	Испания

Таблица 2. Продолжение

Источник	Повышенный уровень экспрессии микроРНК	Пониженный уровень экспрессии микроРНК	Метод исследования	Ткань	Страна
[95]	–	miR-185	ОТ-ПЦР РВ	ПК	Китай
[96]	–	miR-126-3p, -21-5p	То же	ПК	Италия
[97]	miR-572	miR-1249, -320b, -6069	Микрочипы + + ОТ-ПЦР РВ	ПК	Китай
[49]	miR-21, -30d, -34a , -148a	–	ОТ-ПЦР РВ	ПК	США
[30]	–	miR-126 , -26a	То же	ПК	Германия
[98]	miR-148a-3p	miR-222-3p, -342-3p	»	ПК	Италия
[99]	–	miR-126-3p	»	ПК	Италия
[50]	miR-32, -34a , -136, -144 , -193b	let-7c, -7d, -7e, -7f, miR-485-3p	»	ПК	Новая Зеландия
[32]	–	miR-126	»	ПК	Китай
[100]	miR-29c	–	Микрочипы + + ОТ-ПЦР РВ	ПК	Китай
[101]	–	miR-146a	ОТ-ПЦР РВ	ПК	Иран
[32]	miR-210	miR-126	То же	ПК	Египет
[51]	miR-34a	–	»	ПК	Китай
[102]	miR-150 , -miR-30a-5p	miR-15a , -375	»	ПК	Испания
[60]	let-7b, miR-144 , -29a	miR-142	»	ПК	Китай
[103]	miR-30d	–	»	ПК	Индия
[104]	miR-21	–	»	ПК	Италия
[105]	miR-103a	–	»	ПК	Китай
[106]	let-7f-5p, miR-7-5p, -15b-5p, -320c, -205-5p, -335-5p	let-7i-5p	»	ПК	США
[107]	–	miR-30c	»	ПК	Египет
[108]	–	miR-122-5p, -192-5p, -483-5p, -885-5p, -99a-5p, -339-5p, -146a-5p	NGS (Illumina) + + ОТ-ПЦРРВ	ПК	Дания
[59]	miR-144	miR-223	ОТ-ПЦР РВ	ПК	Китай
[69]	–	miR-1, -133a	То же	ППМ	Франция
[26]	miR-106b, -138-1, -142-3p, -142-5p, -143, -144 , -15b, -181a-2 -185, -193a-5p, -30b, -30c-2, -32, -371-5p, -451, -503, -518c, -589, -597, -600, -634, -658, -665, -668, 765, -921, -923, -93, -937	miR-100, -10a, -10b, -126 , -128, -133a, -152, -154, -15a , -190, -196a, -199a-3p, -199a-5p, -208a, -27b, -30e, -331-3p, -342-3p, -362-3p, -374a, -374b, -378, -442a, -423-3p, -424, -455-5p, -519d, -768-3p, -768-5p, -801, -95, -98, -99a	Микрочипы	ППМ	Дания

Таблица 2. Продолжение

Источник	Повышенный уровень экспрессии микроРНК	Пониженный уровень экспрессии микроРНК	Метод исследования	Ткань	Страна
[68]	–	miR-194	Микрочипы + ОТ-ПЦР РВ	ППМ	Австралия
[109]	miRNA-133b-3, -206, -27a-3p	–	ОТ-ПЦР РВ	ППМ	Нидерланды
[47]	miR-34a	–	То же	СК	Китай
[11]	miR-9, -29a, -30d, -34a, -124a, -146a, -375	–	»	СК	Китай
[110]	miR-181a	–	»	СК	Китай
[12]	miR-29a, -375	–	КФ-ПЦР РВ	СК	Китай
[111]	–	miR-503	ОТ-ПЦР РВ	СК	Испания
[112]	–	miR-146a	То же	СК	Эквадор
[113]	–	miR-18a	»	СК	Китай
[114]	–	miR23a, -let-7i, -486, -96, -186, -191, -192, -146a	»	СК	Китай
[33]	–	miR-126	»	СК	Китай
[13]	miR-101, -375, -802	–	»	СК	Япония
[115]	miR-9, -370	–	»	СК	Финляндия
[116]	–	miR-593	»	СК	Китай
[117]	miR-130b-3p, -374a-5p	–	»	СК	Индия
[118]	miR-451a, -4534	miR-320d, -3960, -572	Микрочипы + ОТ-ПЦР РВ	СК	Китай
[119]	–	miR-574-3p, -146a	ОТ-ПЦР РВ	СК	Эквадор
[120]	miR-661, -571, -770-5p, -892b, -1303	–	То же	СК	Китай
[34]	–	miR-126	»	СК	Египет
[121]	miR-221, -222	–	»	СК	Китай
[48]	miR-21, -24-1, -34a, -148a, -27a, -146a, -223, -326	–	»	СК	США
[57]	miR-455-5p, -454-3p, -144-3p, -96-5p	miR-409-3p, -665, -766-3p	»	СК	Китай
[122]	miR-486, -146b, -15b	–	»	СК	Китай
[123]	miR-532-3p, -20b-5p, -150-5p	miR-502-3p, -363-3p, -30d-5p	»	СК	Швеция
[78]	miR-99b, -122	miR-486	Микрочипы + ОТ-ПЦР РВ	СК	Китай
[124]	–	miR-20b	ОТ-ПЦР РВ	СК	Египет
[125]	miR-122	–	То же	СК	Италия
[126]	miR-543	–	»	СК	Китай
[7]	miR-375	–	»	ТПЖ	Китай

Таблица 2. Окончание

Источник	Повышенный уровень экспрессии микроРНК	Пониженный уровень экспрессии микроРНК	Метод исследования	Ткань	Страна
[127]	–	miR-103b	ОТ-ПЦР РВ	Т	Китай
[53]	miR-144 , -150 , -192, -29a , -320	miR-146a, -182, -30d	Микрочипы + + ОТ-ПЦР РВ	ЦК	Испания
[8]	miR-27a, -150 , -192, -320a, -375	miR-17, -92a, -130a, -195, -197, -509-5p, -652	Микрочипы + + ОТ-ПЦР РВ	ЦК	Сингапур
[128]	let-7a	–	ОТ-ПЦР РВ	ЦК	Китай
[129]	–	miR-130a, -10b, -143	То же	ЦК	Китай
[130]	–	miR-15a	»	ЦК	Бахрейн
[27]	–	miR-126	»	ЦК	Бахрейн
[130]	miR-147	–	»	ЦК	Пакистан
[132]	miR-210	–	»	ЦК	Китай
[133]	–	miR-126-p, -181b	»	ЦК	Иран

Примечание. ЖТ – жировая ткань, КПЖ – клетки островков поджелудочной железы, А – агранулоциты, ПК – плазма крови, ППМ – поперечнополосатая мускулатура, СК – сыворотка крови, ТПЖ – ткань поджелудочной железы, Т – тромбоциты, ЦК – цельная кровь, ОТ-ПЦР РВ – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени, КФ-ПЦР РВ – количественная флуоресцентная ПЦР в реальном времени, NGS (next generation sequencing) – секвенирование следующего поколения; полужирным шрифтом выделены микроРНК, ассоциированные с СД2 по результатам четырех и более исследований.

шагом на пути к разработке персонализированного подхода к диагностике и терапии пациентов.

Работа выполнена в рамках темы прикладных научных исследований (ПНИ № АААА-А20-120041390028-0).

Настоящая статья не содержит исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследования.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Всемирная организация здравоохранения. Глобальный доклад по диабету [Global report on diabetes] // Женева. 2018. Лицензия: ССВУ-NC-SA 3.0 IGO.
2. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease // Nat. Rev. Genet. 2011. V. 12. № 12. P. 861–874. <https://doi.org/10.1038/nrg3074>
3. Lu T.X., Rothenberg M.E. MicroRNA // J. Allergy Clin. Immunol. 2018. V. 141. № 4. P. 1202–1207. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.08.034>
4. O'Brien J., Hayder H., Zayed Y. et al. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation // Front. Endocrinol. 2018. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>
5. He Y., Ding Y., Liang B. et al. A systematic study of dysregulated microRNA in type 2 diabetes mellitus // Int. J. Mol. Sci. 2017. V. 18. № 3. Pii. E456. <https://doi.org/10.3390/ijms18030456>
6. Poy M.N., Eliasson L., Krutzfeldt J. et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion // Nature. 2004. V. 432. № 7014. P. 226–230.
7. Zhao H., Guan J., Lee H.M. et al. Up-regulated pancreatic tissue microRNA-375 associates with human type 2 diabetes through beta-cell deficit and islet amyloid deposition // Pancreas. 2010. V. 39. № 6. P. 843–846. <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e3181d12613>
8. Karolina D.S., Tavintharan S., Armugam A. et al. Circulating miRNA profiles in patients with metabolic syndrome // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2012. V. 97. № 12. E2271–6. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-1996>
9. Sun K., Chang X., Yin L. et al. Expression and DNA methylation status of microRNA-375 in patients with type 2 diabetes mellitus // Mol. Med. Rep. 2014. V. 9. № 3. P. 967–972. <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1872>
10. Wang X., Chang X., Li J. et al. DNA methylation of microRNA-375 in impaired glucose tolerance // Exp. Ther. Med. 2014. V. 8. № 3. P. 775–780. <https://doi.org/10.3892/etm.2014.1816>
11. Kong L., Zhu J., Han W. et al. Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: A clinical study // Acta. Diabetol. 2011. V. 48. № 1. P. 61–69. <https://doi.org/10.1007/s00592-010-0226-0>

12. *Liang G., Song Y., Shao D. et al.* The change of serum miR-375 and miR-29a and their correlation with glycemic control and lipid profile in patients with newly diagnosed type 2 diabetes // *Chinese J. Lab. Diagnosis.* 2013. № 17. P. 475–478.
13. *Higuchi C., Nakatsuka A., Eguchi J. et al.* Identification of circulating miR-101, miR-375 and miR-802 as biomarkers for type 2 diabetes // *Metabolism.* 2015. V. 64. № 4. P. 489–497. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.12.003>
14. *Kloosterman W.P., Lagendijk A.K., Ketting R.F. et al.* Targeted inhibition of miRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development // *PLoS Biol.* 2007. V. 5. № 8. e203. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050203>
15. *Keller D.M., McWeeney S., Arsenlis A. et al.* Characterization of pancreatic transcription factor Pdx-1 binding sites using promoter microarray and serial analysis of chromatin occupancy // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. № 44. P. 32084–32092. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700899200>
16. *Li Y., Xu X., Liang Y. et al.* miR-375 enhances palmitate-induced lipopoptosis in insulin-secreting NIT-1 cells by repressing myotrophin (VI) protein expression // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2010. V. 3. № 3. P. 254–264.
17. *Ouaamari A.E., Baroukh N., Martens G.A. et al.* miR-375 targets 3' phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and regulates glucose-induced biological responses in pancreatic b-cells // *Diabetes.* 2008. V. 57. № 10. P. 2708–2717. <https://doi.org/10.2337/db07-1614>
18. *Agarwal V., Bell G.W., Nam J., Bartel D.P.* Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs // *Elife.* 2015. № 4. e05005. <https://doi.org/10.7554/eLife.05005>
19. *Scheepers A., Joost H., Schürmann A.* The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function // *J. Parenter. Enteral Nutr.* 2004. V. 28. № 5. P. 364–371. <https://doi.org/10.1177/0148607104028005364>
20. *Wang S., Aurora A.B., Johnson B.A. et al.* An endothelial-specific microRNA governs vascular integrity and angiogenesis // *Dev. Cell.* 2008. V. 15. № 2. P. 261–271. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.07.002>
21. *Carmeliet P., Jain R.K.* Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis // *Nature.* 2011. V. 473. № 7347. P. 298–307. <https://doi.org/10.1038/nature10144>
22. *Wang L., Lee A.Y.W., Wigg J.P. et al.* miR-126 regulation of angiogenesis in age-related macular degeneration in CNV mouse model // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. V. 17. № 6. P. 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms17060895>
23. *Schober A., Nazari-Jahantigh M., Wei Y. et al.* MicroRNA-126-5p promotes endothelial proliferation and limits atherosclerosis by suppressing Dlk1 // *Nat. Med.* 2014. V. 20. № 4. P. 368–376. <https://doi.org/10.1038/nm.3487>
24. *Rodríguez P., Higuera M.A., González-Rajal A. et al.* The non-canonical NOTCH ligand DLK1 exhibits a novel vascular role as a strong inhibitor of angiogenesis // *Cardiovasc. Res.* 2012. V. 93. № 2. P. 232–241. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr296>
25. *Meng S., Cao J.T., Zhang B. et al.* Downregulation of microRNA-126 in endothelial progenitor cells from diabetes patients, impairs their functional properties, via target gene Spred-1 // *J. Mol. Cell Cardiol.* 2012. V. 53. № 1. P. 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.04.003>
26. *Gallagher I.J., Scheele C., Keller P. et al.* Integration of microRNA changes in vivo identifies novel molecular features of muscle insulin resistance in type 2 diabetes // *Genome Med.* 2010. V. 2. № 2. P. 1–18. <https://doi.org/10.1186/gm130>
27. *Al-Kafaji G., Al-Mahroos G., Abdulla Al-Muhtareh H. et al.* Circulating endothelin-enriched microRNA-126 as a potential biomarker for coronary artery disease in type 2 diabetes mellitus patients // *Biomarkers.* 2017. V. 22. № 3–4. P. 268–278. <https://doi.org/10.1080/1354750X.2016.1204004>
28. *Zampetaki A., Kiechl S., Drozdov I. et al.* Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes // *Circ. Res.* 2010. V. 107. № 6. P. 810–817. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.226357>
29. *Ortega F.J., Mercader J.M., Moreno-Navarrete J.M. et al.* Profiling of circulating microRNAs reveals common microRNAs linked to type 2 diabetes that change with insulin sensitization // *Diabetes Care.* 2014. V. 37. № 5. P. 1375–1383. <https://doi.org/10.2337/dc13-1847>
30. *Jansen F., Wang H., Przybilla D. et al.* Vascular endothelial microparticles-incorporated microRNAs are altered in patients with diabetes mellitus // *Cardiovasc. Diabetol.* 2016. V. 15. № 49. P. 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12933-016-0367-8>
31. *Zhang J., Sun X.J., Chen J. et al.* Increasing the miR-126 expression in the peripheral blood of patients with diabetic foot ulcers treated with maggot debridement therapy // *J. Diabetes Complications.* 2017. V. 31. № 1. P. 241–244. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2016.07.026>
32. *Amr K.S., Abdelmawgoud H., Ali Z.Y. et al.* Potential value of circulating microRNA-126 and microRNA-210 as biomarkers for type 2 diabetes with coronary artery disease // *Br. J. Biomed. Sci.* 2018. V. 75. № 2. P. 82–87. <https://doi.org/10.1080/09674845.2017.1402404>
33. *Liu Y., Gao G., Yang C. et al.* The role of circulating microRNA-126 (miR-126): a novel biomarker for screening prediabetes and newly diagnosed type 2 diabetes mellitus // *Int. J. Mol. Sci.* 2014. V. 15. № 6. P. 10567–10577. <https://doi.org/10.3390/ijms150610567>
34. *Rezk N.A., Sabbah N.A., Saad M.S.* Role of microRNA 126 in screening, diagnosis, and prognosis of diabetic patients in Egypt // *IUBMB Life.* 2016. V. 68. № 6. P. 452–458. <https://doi.org/10.1002/iub.1502>
35. *Duan Y., Zou J., Mao J. et al.* Plasma miR-126 expression correlates with risk and severity of psoriasis and its high level at baseline predicts worse response to Tripterygium wilfordii Hook F in combination with acitretin //

- Biomed. Pharmacother. 2019. V. 115. P. 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108761>
36. *Ebrahimi F., Gopalan V., Smith R.A. et al.* miR-126 in human cancers: clinical roles and current perspectives // *Exp. Mol. Pathol.* 2014. V. 96. № 1. P. 98–107.
<https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2013.12.004>
 37. *Wen Q., Zhao J., Bai L. et al.* miR-126 inhibits papillary thyroid carcinoma growth by targeting LRP6 // *Oncol. Rep.* 2015. V. 34. № 4. P. 2202–2210.
<https://doi.org/10.3892/or.2015.4165>
 38. *Fichtlscherer S., De Rosa S., Fox H. et al.* Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease // *Circ. Res.* 2010. V. 107. № 5. P. 677–684.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.215566>
 39. *Wang X., Lian Y., Wen X. et al.* Expression of miR-126 and its potential function in coronary artery disease // *Afr. Health Sci.* 2017. V. 17. № 2. P. 474–480.
<https://doi.org/10.4314/ahs.v17i2.22>
 40. *Liu R., Liu C.M., Cui L.L. et al.* Expression and significance of MiR-126 and VEGF in proliferative diabetic retinopathy // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2019. V. 23. № 15. P. 6387–6393.
https://doi.org/10.26355/eurrev_201908_18518
 41. *Cheng F., Lu L., Wang H. et al.* Expression and significance of miR-126 and miR-145 in infertility due to endometriosis // *J. Coll. Physicians Surg. Pak.* 2019. V. 29. № 6. P. 585–587.
<https://doi.org/10.29271/jcpsp.2019.06.585>
 42. *Pan X., Hou R., Ma A. et al.* Atorvastatin upregulates the expression of miR-126 in apolipoprotein E-knockout mice with carotid atherosclerotic plaque // *Cell. Mol. Neurobiol.* 2017. V. 37. № 1. P. 29–36.
<https://doi.org/10.1007/s10571-016-0331-x>
 43. *Bommer G.T., Gerin I., Feng Y. et al.* p53-Mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes // *Curr. Biol.* 2007. V. 17. № 15. P. 1298–1307.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.06.068>
 44. *Raver-Shapira N., Marciano E., Meiri E. et al.* Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis // *Mol. Cell.* 2007. V. 26. № 5. P. 731–743.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.05.017>
 45. *He L., He X., Lim L. P. et al.* A microRNA component of the p53 tumour suppressor network // *Nature.* 2007. V. 447. № 7148. P. 1130–1134.
<https://doi.org/10.1038/nature05939>
 46. *Lovis P., Roggli E., Laybutt D.R. et al.* Alterations in microRNA expression contribute to fatty acid-induced pancreatic β -cell dysfunction // *Diabetes.* 2008. V. 57. № 10. P. 2728–2736.
<https://doi.org/10.2337/db07-1252>
 47. *Kong L., Han W., Jiang X. et al.* Expression and clinical significance of peripheral miR-34a during the onset of type 2 diabetes // *J. Shandong University (Health Sciences).* 2010. V. 48. № 10. P. 1–3.
<https://doi.org/10.1007/s00592-010-0226-0>
 48. *Nunez Lopez Y.O., Garufi G., Seyhan A.A.* Altered levels of circulating cytokines and microRNAs in lean and obese individuals with prediabetes and type 2 diabetes // *Mol. Biosyst.* 2016. V. 3. № 1. P. 106–121.
<https://doi.org/10.1039/c6mb00596a>
 49. *Seyhan A.A., Nunez Lopez Y.O., Xie H. et al.* Pancreas-enriched miRNAs are altered in the circulation of subjects with diabetes: a pilot cross-sectional study // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 1–15.
<https://doi.org/10.1038/srep31479>
 50. *Jones A., Danielson K.M., Benton M.C. et al.* miRNA signatures of insulin resistance in obesity // *Obesity (Silver Spring).* 2017. V. 25. № 10. P. 1734–1744.
<https://doi.org/10.1002/oby.21950>
 51. *Sun Y., Peng R., Li A.* Sequence variation in microRNA-34a is associated with diabetes mellitus susceptibility in a southwest Chinese Han population // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2018. V. 11. № 3. P. 1637–1644.
 52. *Shen Y., Xu H., Pan X. et al.* miR-34a and miR-125b are upregulated in peripheral blood mononuclear cells from patients with type 2 diabetes mellitus // *Exp. Ther. Med.* 2017. V. 14. № 6. P. 5589–5596.
<https://doi.org/10.3892/etm.2017.5254>
 53. *Karolina D.S., Armugam A., Tavintharan S. et al.* MicroRNA 144 impairs insulin signaling by inhibiting the expression of insulin receptor substrate 1 in type 2 diabetes mellitus // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 8. e22839.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022839>
 54. *Copps K.D., White M.F.* Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2 // *Diabetologia.* 2012. V. 55. № 10. P. 2565–2582.
<https://doi.org/10.1007/s00125-012-2644-8>
 55. *Thong F.S., Dugani C.B., Klip A.* Turning signals on and off: GLUT4 traffic in the insulin-signaling highway // *Physiology (Bethesda).* 2005. V. 20. P. 271–284.
<https://doi.org/10.1152/physiol.00017.2005>
 56. *Shen L., Li Q., Wang J. et al.* miR-144-3p promotes adipogenesis through releasing C/EBP α from Klf3 and CtBP2 // *Front. Genet.* 2018. V. 9. P. 1–11.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00677>
 57. *Yang Z.M., Chen L.H., Hong M.* Serum microRNA profiling and bioinformatics analysis of patients with type 2 diabetes mellitus in a Chinese population // *Mol. Med. Rep.* 2017. V. 15. № 4. P. 2143–2153.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6239>
 58. *Wang X., Sundquist J., Zöller B. et al.* Determination of 14 circulating microRNAs in Swedes and Iraqis with and without diabetes mellitus type 2 // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 1. e86792.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086792>
 59. *Yang S., Zhao J., Chen Y. et al.* Biomarkers associated with ischemic stroke in diabetes mellitus patients // *Cardiovasc. Toxicol.* 2016. V. 16. № 3. P. 213–222.
<https://doi.org/10.1007/s12012-015-9329-8>
 60. *Liang Y.Z., Dong J., Zhang J. et al.* Identification of neuroendocrine stress response-related circulating microRNAs as biomarkers for type 2 diabetes mellitus and insulin resistance // *Front. Endocrinol (Lausanne).* 2018. V. 28. № 9. P. 1–11.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00132>
 61. *Lareyre F., Clément M., Moratal C. et al.* Differential micro-RNA expression in diabetic patients with abdominal aortic aneurysm // *Biochimie.* 2019. V. 162. P. 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.03.012>

62. Министерство здравоохранения Российской Федерации. Клинические рекомендации по ведению больных с метаболическим синдромом // Москва. 2013. 43 с.
63. *Chen B., Luo L., Wei X. et al.* Altered plasma miR-144 as a novel biomarker for coronary artery disease // *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2018. V. 48. № 4. P. 440–445.
64. *Slusarza A., Pulakat L.* The two faces of miR-29 // *Cardiovasc. Med. (Hagerstown)*. 2015. V. 16. № 7. P. 480–490.
<https://doi.org/10.2459/JCM.0000000000000246>
65. *Yang W.M., Jeong H.J., Park S.Y. et al.* Induction of miR-29a by saturated fatty acids impairs insulin signaling and glucose uptake through translational repression of IRS-1 in myocytes // *FEBS Lett.* 2014. V. 588. № 13. P. 2170–2176.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.011>
66. Майоров А.Ю. Инсулинорезистентность в патогенезе сахарного диабета 2 типа // Сахарный диабет. 2011. № 1. С. 35–43.
67. *Funaki M., Randhawa P., Janmey P.A.* Separation of insulin signaling into distinct GLUT4 translocation and activation steps // *Mol Cell Biol.* 2004. V. 24. № 17. P. 7567–7577.
<https://doi.org/10.1128/MCB.24.17.7567-7577.2004>
68. *Latouche C., Natoli A., Reddy-Luthmoodoo M. et al.* MicroRNA-194 modulates glucose metabolism and its skeletal muscle expression is reduced in diabetes // *PLoS One.* 2016. V. 11. № 5. e0155108.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155108>
69. *Granjon A., Gustin M.P., Rieusset J. et al.* The microRNA signature in response to insulin reveals its implication in the transcriptional action of insulin in human skeletal muscle and the role of a sterol regulatory element-binding protein-1c/myocyte enhancer factor 2C pathway // *Diabetes.* 2009. V. 58. № 11. P. 2555–2564.
<https://doi.org/10.2337/db09-0165>
70. *Klötting N., Berthold S., Kovacs P. et al.* MicroRNA expression in human omental and subcutaneous adipose tissue // *PLoS One.* 2009. V. 4. № 3. e4699.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004699>
71. *Altarejos J.Y., Montminy M.* CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2011. V. 12. № 3. P. 141–151.
<https://doi.org/10.1038/nrm3072>
72. *Cho I., Jung M., Kwon K. et al.* Deregulation of CREB signaling pathway induced by chronic hyperglycemia downregulates neuroD transcription // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 4. e34860.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034860>
73. *Pek S.L., Sum C.F., Lin M.X. et al.* Circulating and visceral adipose miR-100 is down-regulated in patients with obesity and type 2 diabetes // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2016. V. 427. P. 112–123.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.03.010>
74. *Kameswaran V., Bramswig N.C., McKenna L.B. et al.* Epigenetic regulation of the DLK1-MEG3 microRNA cluster in human type 2 diabetic islets // *Cell. Metab.* 2014. V. 19. № 1. P. 135–145.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.11.016>
75. *Shojima N., Hara K., Fujita H. et al.* Depletion of homeodomain-interacting protein kinase 3 impairs insulin secretion and glucose tolerance in mice // *Diabetologia.* 2012. V. 55. № 12. P. 3318–3330.
<https://doi.org/10.1007/s00125-012-2711-1>
76. *Locke J.M., da Silva X.G., Dawe H.R. et al.* Increased expression of miR-187 in human islets from individuals with type 2 diabetes is associated with reduced glucose-stimulated insulin secretion // *Diabetologia.* 2014. V. 57. № 1. P. 122–128.
<https://doi.org/10.1007/s00125-013-3089-4>
77. *Hou X., Wu W., Yin B. et al.* MicroRNA-463-3p/ABCG4: A new axis in glucose-stimulated insulin secretion // *Obesity (Silver Spring)*. 2016. V. 24. № 11. P. 2368–2376.
<https://doi.org/10.1002/oby.21655>
78. *Shaker O.G., Abdelaleem O.O., Mahmoud R.H. et al.* Diagnostic and prognostic role of serum miR-20b, miR-17-3p, HOTAIR, and MALAT1 in diabetic retinopathy // *IUBMB Life.* 2019. V. 71. № 3. P. 310–320.
<https://doi.org/10.1002/iub.1970>
79. *Chang X., Li S., Li J. et al.* Ethnic differences in microRNA-375 expression level and DNA methylation status in type 2 diabetes of Han and Kazak populations // *J. Diabetes Research.* 2014.
<https://doi.org/10.1155/2014/761938>
80. *Ortega F.J., Moreno-Navarrete J.M., Pardo G. et al.* MiRNA expression profile of human subcutaneous adipose and during adipocyte differentiation // *PLoS One.* 2010. V. 5. № 2. e9022.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009022>
81. *Sebastiani G., Po A., Miele E. et al.* MicroRNA-124a is hyperexpressed in type 2 diabetic human pancreatic islets and negatively regulates insulin secretion // *Acta. Diabetol.* 2015. V. 52. № 3. P. 523–530.
<https://doi.org/10.1007/s00592-014-0675-y>
82. *Balasubramanyam M., Aravind S., Gokulakrishnan K. et al.* Impaired miR-146a expression links subclinical inflammation and insulin resistance in type 2 diabetes // *Mol. Cell. Biochem.* 2011. V. 351. № 1–2. P. 197–205.
<https://doi.org/10.1007/s11010-011-0727-3>
83. *Corral-Fernández N.E., Salgado-Bustamante M., Martínez-Leija M.E. et al.* Dysregulated miR-155 expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with type 2 diabetes // *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* 2013. V. 121. № 6. P. 347–353.
<https://doi.org/10.1055/s-0033-1341516>
84. *Baldeón R.L., Weigelt K., de Wit H. et al.* Type 2 diabetes monocyte microRNA and mRNA expression: Dyslipidemia associates with increased differentiation-related genes but not inflammatory activation // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 6. e0129421.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129421>
85. *Lenin R., Sankaramoorthy A., Mohan V. et al.* Altered immunometabolism at the interface of increased endoplasmic reticulum (ER) stress in patients with type 2 diabetes // *J. Leukoc. Biol.* 2015. V. 9. № 4. P. 615–622.
<https://doi.org/10.1189/jlb.3A1214-609R>
86. *Mazloom H., Alizadeh S., Pasalar P. et al.* Downregulated microRNA-155 expression in peripheral blood mononuclear cells of type 2 diabetic patients is not correlated with increased inflammatory cytokine production // *Cytokine.* 2015. V. 76. № 2. P. 403–408.
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.07.007>

87. Long Y., Zhan Q., Yuan M. et al. The expression of microRNA-223 and FAM5C in cerebral infarction patients with diabetes mellitus // *Cardiovasc. Toxicol.* 2017. V. 17. № 1. P. 42–48.
<https://doi.org/10.1007/s12012-015-9354-7>
88. Wang S.S., Li Y.Q., Liang Y.Z. et al. Expression of miR-18a and miR-34c in circulating monocytes associated with vulnerability to type 2 diabetes mellitus and insulin resistance // *J. Cell. Mol. Med.* 2017. V. 21. № 12. P. 3372–3380.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.13240>
89. Andoorfar S., Hosseini Tafreshi S.A., Rezvani Z. Assessment of the expression level of miRNA molecules using a semi-quantitative RT-PCR approach // *Mol. Biol. Rep.* 2019. V. 46. № 5. P. 5057–5062.
<https://doi.org/10.1007/s11033-019-04959-5>
90. Dehghani M.R., Aghaei Zarch S.M., Vahidi Mehrjardi M.Y. et al. Evaluation of miR-181b and miR-126-5p expression levels in T2DM patients compared to healthy individuals: Relationship with NF-κB gene expression // *Endocrinol. Diabetes Nutr.* 2020. Pii: S2530-0164(19). P. 30252–30256.
<https://doi.org/10.1016/j.endinu.2019.09.009>
91. Rong Y., Bao W., Shan Z. et al. Increased microRNA-146a levels in plasma of patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 9. e73272.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073272>
92. Duan X., Zhan Q., Song B. et al. Detection of platelet microRNA expression in patients with diabetes mellitus with or without ischemic stroke // *J. Diabetes Complications.* 2014. V. 28. № 5. P. 705–710.
<https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2014.04.012>
93. Santovito D., De Nardis V., Marcantonio P. et al. Plasma exosome microRNA profiling unravels a new potential modulator of adiponectin pathway in diabetes: Effect of glycemic control // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014. V. 99. № 9. P. 1681–1685.
<https://doi.org/10.1210/jc.2013-3843>
94. Yan S.T., Li C.L., Tian H. et al. MiR-199a is overexpressed in plasma of type 2 diabetes patients which contributes to type 2 diabetes by targeting GLUT4 // *Mol. Cell. Biochem.* 2014. V. 397. № 1–2. P. 45–51.
<https://doi.org/10.1007/s11010-014-2170-8>
95. Bao L., Fu X., Si M. et al. MicroRNA-185 targets SOCS3 to inhibit beta-cell dysfunction in diabetes // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 2. e0116067.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116067>
96. Olivieri F., Spazzafumo L., Bonafè M. et al. MiR-21-5p and miR-126a-3p levels in plasma and circulating angiogenic cells: Relationship with type 2 diabetes complications // *Oncotarget.* 2015. V. 6. № 34. P. 35372–35382.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.6164>
97. Yan S., Wang T., Huang S. et al. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with prediabetes and newly diagnosed type 2 diabetes // *Acta Diabetol.* 2016. V. 53. № 5. P. 693–702.
<https://doi.org/10.1007/s00592-016-0837-1>
98. de Candia P., Spinetti G., Specchia C. et al. A unique plasma microRNA profile defines type 2 diabetes progression // *PLoS One.* 2017. V. 12. № 12. e0188980.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188980>
99. Giannella A., Radu C.M., Franco L. et al. Circulating levels and characterization of microparticles in patients with different degrees of glucose tolerance // *Cardiovasc. Diabetol.* 2017. V. 16. № 1. P. 118.
<https://doi.org/10.1186/s12933-017-0600-0>
100. Guo J., Li J., Zhao J. et al. MiRNA-29c regulates the expression of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy by targeting tristetraprolin // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 1–13.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-01027-5>
101. Alipoor B., Ghaedi H., Meshkani R. et al. The rs2910164 variant is associated with reduced miR-146a expression but not cytokine levels in patients with type 2 diabetes // *J. Endocrinol. Invest.* 2018. V. 41. № 5. P. 557–566.
<https://doi.org/10.1007/s40618-017-0766-z>
102. Jiménez-Lucena R., Camargo A., Alcalá-Díaz J.F. et al. A plasma circulating miRNAs profile predicts type 2 diabetes mellitus and prediabetes: From the CORDIOPREV study // *Exp. Mol. Med.* 2018. V. 50. № 12. P. 1–12.
<https://doi.org/10.1038/s12276-018-0194-y>
103. Sucharita S., Ashwini V., Prabhu J.S. et al. The role of circulating microRNA in the regulation of beta cell function and insulin resistance among Indians with type 2 diabetes // *Indian J. Endocrinol. Metab.* 2018. V. 22. № 6. P. 770–773.
https://doi.org/10.4103/ijem.IJEM_162_18
104. La Sala L., Mrakic-Spota S., Tagliabue E. et al. Circulating microRNA-21 is an early predictor of ROS-mediated damage in subjects with high risk of developing diabetes and in drug-naïve T2D // *Cardiovasc. Diabetol.* 2019. V. 18. № 1. P. 1–12.
<https://doi.org/10.1186/s12933-019-0824-2>
105. Luo M., Xu C., Luo Y. et al. Circulating miR-103 family as potential biomarkers for type 2 diabetes through targeting CAV-1 and SFRP4 // *Acta Diabetol.* 2020. V. 57. № 3. P. 309–322.
<https://doi.org/10.1007/s00592-019-01430-6>
106. Atkin S.L., Ramachandran V., Yousri N.A. et al. Changes in blood microRNA expression and early metabolic responsiveness 21 days following bariatric surgery // *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 2019. V. 9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00773>
107. Luo M., Wang G., Xu C. et al. Circulating miR-30c as a predictive biomarker of type 2 diabetes mellitus with coronary heart disease by regulating PAI-1/VN interactions // *Life Sci.* 2019. V. 239.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117092>
108. Ghai V., Kim T.K., Etheridge A. et al. Extracellular vesicle encapsulated microRNAs in patients with type 2 diabetes are affected by metformin treatment // *J. Clin. Med.* 2019. V. 8. № 5. Pii: E617.
<https://doi.org/10.3390/jcm8050617>
109. Dahlmans D., Houzelle A., Jörgensen J.A. et al. Evaluation of muscle microRNA expression in relation to human peripheral insulin sensitivity: A cross-sectional study in metabolically distinct subject groups // *Front. Physiol.* 2017. V. 8. P. 1–10.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00711>
110. Zhou B., Li C., Qi W. et al. Downregulation of miR-181a upregulates sirtuin-1 (SIRT1) and improves hepatic insulin sensitivity // *Diabetologia.* 2012. V. 55. № 7.

- P. 2032–2043.
<https://doi.org/10.1007/s00125-012-2539-8>
111. *Pescador N., Pérez-Barba M., Ibarra J.M. et al.* Serum circulating microRNA profiling for identification of potential type 2 diabetes and obesity biomarkers // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 10. e77251.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077251>
112. *Baldeón R.L., Weigelt K., de Wit H. et al.* Decreased serum level of miR-146a as sign of chronic inflammation in type 2 diabetic patients // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 12. e115209.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115209>
113. *Mao G., Liu L.* MicroRNA-18a is a genetic marker for the early diagnosis of cerebral injury induced by type 2 diabetes // *Exp. Ther. Med*. 2014. V. 8. № 6. P. 1901–1905.
<https://doi.org/10.3892/etm.2014.1996>
114. *Yang Z., Chen H., Si H. et al.* Serum miR-23a, a potential biomarker for diagnosis of pre-diabetes and type 2 diabetes // *Acta. Diabetol*. 2014. V. 51. № 5. P. 823–831.
<https://doi.org/10.1007/s00592-014-0617-8>
115. *Motawae T.M., Ismail M.F., Shabayek M.I.* MicroRNAs 9 and 370 association with biochemical markers in T2D and CAD complication of T2D // *PLoS One*. 2015. V. 10. № 5. e0126957.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126957>
116. *Wu L., Dai X., Zhan J. et al.* Profiling peripheral microRNAs in obesity and type 2 diabetes mellitus // *APMIS*. 2015. V. 123. № 7. P. 580–585.
<https://doi.org/10.1111/apm.12389>
117. *Prabu P., Rome S., Sathishkumar C. et al.* Circulating MiRNAs of asian indian phenotype identified in subjects with impaired glucose tolerance and patients with type 2 diabetes // *PLoS One*. 2015. V. 10. № 5. e0128372.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128372>
118. *Ding L., Ai D., Wu R. et al.* Identification of the differential expression of serum microRNA in type 2 diabetes // *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 2016. V. 80. № 3. P. 461–465.
<https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1107460>
119. *Baldeón R.L., Weigelt K., de Wit H. et al.* Study on inflammation-related genes and microRNAs, with special emphasis on the vascular repair factor HGF and miR-574-3p, in monocytes and serum of patients with T2D // *Diabetol. Metab. Syndr*. 2016. V. 8. P. 1–12.
<https://doi.org/10.1186/s13098-015-0113-5>
120. *Wang C., Wan S., Yang T. et al.* Increased serum microRNAs are closely associated with the presence of microvascular complications in type 2 diabetes mellitus // *Sci. Rep*. 2016. V. 6.
<https://doi.org/10.1038/srep20032>
121. *Li M.Y., Pan S.R., Qiu A.Y. et al.* Roles of microRNA-221/222 in type 2 diabetic patients with post-menopausal breast cancer // *Genet. Mol. Res*. 2016. V. 15. № 2.
<https://doi.org/10.4238/gmr.15027259>
122. *Cui X., You L., Zhu L. et al.* Change in circulating microRNA profile of obese children indicates future risk of adult diabetes // *Metabolism*. 2018. V. 78. P. 95–105.
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.09.006>
123. *Katayama M., Wiklander O.P.B., Fritz T. et al.* Circulating exosomal miR-20b-5p is elevated in type 2 diabetes and could impair insulin action in human skeletal muscle // *Diabetes*. 2019. V. 68. № 3. P. 515–526.
<https://doi.org/10.2337/db18-0470>
124. *Regmi A., Liu G., Zhong X. et al.* Evaluation of serum microRNAs in patients with diabetic kidney disease: A nested case-controlled study and bioinformatics analysis // *Med. Sci. Monit*. 2019. V. 25. P. 1699–1708.
<https://doi.org/10.12659/MSM.913265>
125. *Willeit P., Skrobilin P., Moschen A.R. et al.* Circulating microRNA-122 is associated with the risk of new-onset metabolic syndrome and type 2 diabetes // *Diabetes*. 2017. V. 66. № 2. P. 347–357.
<https://doi.org/10.2337/db16-0731>
126. *Zhao Q., Gu Y., Wei Y. et al.* Screening and identification of circulating miRNA molecular markers in T2DM based on molecular network // *J. diabetes and its complications*. 2020. V. 34. № 6.
<https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2019.107443>
127. *Luo M., Li R., Deng X. et al.* Platelet-derived miR-103b as a novel biomarker for the early diagnosis of type 2 diabetes // *Acta. Diabetol*. 2015. V. 52. № 5. P. 943–949.
<https://doi.org/10.1007/s00592-015-0733-0>
128. *Zhou J., Peng R., Li T. et al.* A potentially functional polymorphism in the regulatory region of let-7a-2 is associated with an increased risk for diabetic nephropathy // *Gene*. 2013. V. 527. № 2. P. 456–461.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.06.088>
129. *Jiao Y., Zhu M., Mao X. et al.* MicroRNA-130a expression is decreased in Xinjiang Uygur patients with type 2 diabetes mellitus // *Am. J. Transl. Res*. 2015. V. 7. № 10. P. 1984–1991.
130. *Al-Kafaji G., Al-Mahroos G., Alsayed N.A. et al.* Peripheral blood microRNA-15a is a potential biomarker for type 2 diabetes mellitus and pre-diabetes // *Mol. Med. Rep*. 2015. V. 12. № 5. P. 7485–7490.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4416>
131. *Moez S., Riaz S., Masood N. et al.* Evaluation of the rs3088442 G>A SLC22A3 gene polymorphism and the role of microRNA 147 in groups of adult pakistani populations with type 2 diabetes in response to metformin // *Can. J. Diabetes*. 2019. V. 43. № 2. P. 128–135. e3.
<https://doi.org/10.1016/j.cjcd.2018.07.001>
132. *Li X., Jia Z., Zhao X. et al.* Expression of miR-210 in the peripheral blood of patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus and its effect on the number and function of endothelial progenitor cells // *Microvascular Res*. 2020. № 131.
<https://doi.org/10.1016/j.mvr.2020.104032>
133. *Dehghani M.R., Aghaei Zarch S.M., Vahidi Mehrjardi M.Y. et al.* Evaluation of miR-181b and miR-126-5p expression levels in T2DM patients compared to healthy individuals: Relationship with NF-κB gene expression // *Endocrinol Diabetes Nutr*. 2020. V. 67. № 7. P. 454–460.
<https://doi.org/10.1016/j.endinu.2019.09.009>

MicroRNAs as a Potential Biomarkers of Type 2 Diabetes

Z. N. Tonyan^{a,*}, Y. A. Nasykhova^{a,b}, A. A. Mikhailova^{a,b}, and A. S. Glotov^{a,b}

^a*D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, 199034 Russia*

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

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

MicroRNAs are small non-coding RNAs that control post-transcriptional regulation of gene expression. Many works have been published demonstrating changes in the miRNA expression level in type 2 diabetes patients. A systematic review of 91 studies published from November 2009 to June 2020 which characterized the changes in miRNA expression in patients with type 2 diabetes was performed. Possible target genes and related mechanisms of participation in glucose metabolism of the most studied miR-29a, -34a, -126, -144, -375 and the prospects for using these miRNAs as potential biomarkers of type 2 diabetes mellitus are discussed.

Keywords: miRNA, type 2 diabetes, biomarker.

ОБЗОРНЫЕ
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 57.02:57.04:575:636.01

ЭКСПЕРИМЕНТ ПО ДОМЕСТИКАЦИИ ЛИСИЦ И ЭВОЛЮЦИЯ СОБАК
С ПОЗИЦИИ СОВРЕМЕННЫХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ
И АРХЕОЛОГИЧЕСКИХ ДАННЫХ

© 2021 г. Л. Н. Трут¹, *, А. В. Харламова¹, А. С. Пилипенко¹, Ю. Э. Гербек¹, **

¹Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: trut@bionet.nsc.ru

**e-mail: herbek@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 26.08.2020 г.

После доработки 03.12.2020 г.

Принята к публикации 28.12.2020 г.

Одомашнивание растений и животных — одно из самых значительных культурных достижений, повлиявших на эволюционную историю человека. Первым одомашненным животным была собака. Несмотря на многочисленные исследования, ранние этапы доместикации собаки остаются малопонятными. В обзоре подчеркиваются параллели в изменении поведения и его молекулярно-генетических основ у доместизируемых лисиц и собак, с особым акцентом на “древних” породах. Описаны три подхода к изучению молекулярно-генетических механизмов доместикации и даны некоторые их результаты, полученные путем использования современных методов, включая высокопроизводительное секвенирование. Первый подход — экспериментальное моделирование ранних этапов доместикации на промышленном объекте — лисице. Второй подход — сравнительный анализ современных собак и волков. Третий подход включает палеогенетический анализ древних собак и волков с учетом их археологического контекста. Обсуждены филогенетические и филогеографические подходы к изучению одомашнивания собаки и их роль в комплексной реконструкции механизмов доместикации. Актуальные затруднения, связанные с оценкой времени, географической локализацией и реконструкцией молекулярных механизмов доместикации собаки, рассмотрены в контексте стратегий формирования выборок для геномного анализа. Обсуждается возможная роль генов сигнальной системы глутаматных рецепторов и клеток нервного гребня, имеющих широкий плейотропный эффект, в качестве важнейших мишеней отбора при экспериментальной и исторической доместикации. В заключение еще раз подчеркивается целесообразность изучения механизмов доместикации не только и, возможно, не столько путем исследования взрослых животных, сколько с помощью анализа различных стадий развития как на молекулярном, так и на организменном уровне.

Ключевые слова: генетически ручные лисицы, древние породы собак, гены нейротрансмиттерных систем, поведение, доместикационный синдром.

DOI: 10.31857/S0016675821070146

Несмотря на то что история доместикации животных насчитывает более десятка тысячелетий, а Дарвин описал изменения, происходящие при доместикации, еще в 1859 и 1868 гг. [1, 2], дебаты о том, в чем состоит эволюционное существо этого величайшего процесса, не прекращаются до сих пор.

В эволюционно-биологической науке существуют разные точки зрения, теории и концепции, обсуждающие закономерности процесса одомашнивания животных, в ходе которого в той или иной степени изменились многие биологические системы организма.

Современные экспериментальные разработки и теоретические построения используют во мно-

гом в качестве модельного объекта собаку (*Canis familiaris*) — первый одомашненный вид и чаще рассматривают вопросы времени и места одомашнивания собаки. Главному же эволюционному вопросу — как происходило в историческом процессе превращение дикого волка в домашнюю собаку, как начиналась доместикация и что двигало ее вперед — уделяется меньше внимания. Вовлекается ли в этот процесс поведение и как влияет на него интенсификация социальных связей животных с человеком, которая, безусловно, происходит у доместизируемых животных, — эти вопросы также нечасто затрагиваются исследователями. Обо всех этих вопросах много размышлял в свое время российский генетик-эволюционист

Д.К. Беляев [3]. Он не только теоретически анализировал исторический процесс domestikации. Он организовал необычайный эволюционный эксперимент по отбору лисиц (*Vulpes vulpes*) на свойства толерантного реагирования на человека.

На основе полученных в ходе этого эксперимента фактов Беляев сформулировал принципиально новое сначала представление, а позднее разработал концепцию о наличии в природе дестабилизирующего отбора как специфической формы движущего отбора. Результатом действия такого отбора является дестабилизация регуляторных систем онтогенеза и, как следствие, повышение темпов формообразования [3].

Безусловно, такой крупномасштабный эволюционно-биологический процесс как domestikация является мультстадийным процессом, он проходил несколько этапов, на каждом из которых роль различных факторов и их взаимодействие могли меняться. Для их изучения необходим интегративный подход, который бы мог учитывать сложность всех взаимодействий.

На самом начальном этапе domestikации, когда делались первые шаги в истории вида в освоении новой экологической ниши и в становлении отношений между животным и новым фактором социальной среды — человеком, главная эволюционная роль в этом процессе оставалась еще за естественным отбором. Человек был только фактором, сместившим направление его действия на поведение, на способность сосуществовать в новой нише — рядом с человеком. Этот период действия естественного отбора называют теперь периодом протодомestikации [4]. Лишь с течением времени естественный отбор постепенно уступал место искусственному, но сначала — бессознательному, несистематическому, который, вероятно, применялся еще с древних времен. Бессознательный, ненаправленный отбор в ходе исторической domestikации переходил в систематический, сознательно направленный на те или иные свойства [5].

Трудно сказать, когда происходила в истории domestikации смена одной формы отбора на другую. Вероятно, естественный отбор, векторизованный на поведение, действовал десятки или даже сотни тысяч лет. Во всяком случае кости волков находили вместе с костями архаичного человека в нескольких местах, датируемых 150–300 тыс. лет до настоящего времени (наст.вр.) [4, 6, 7]; места расселения и охоты должны были пересекаться, а значит уже тогда волк и человек могли адаптироваться друг к другу [6]. Однако доказательств их социального взаимодействия в этот период нет.

Невозможно определить начало действия искусственного отбора. Бесспорно только то, что с началом сознательного искусственного отбора началась новая эпоха в эволюции домашних животных. Ее характер и результаты во многом мог-

ли быть определены самым начальным периодом domestikации, когда действовал в основном естественный отбор по поведению. Вполне понятно, что никаких документальных свидетельств о ходе этого периода наука не имеет. Однако гипотетически предлагались разные сценарии [8, 9]. В одних инициатором сближения с человеком был волк — он осваивал новую более выгодную экологическую нишу; в других — инициировал одомашнивание волка сам человек, видя в нем успешного партнера в охоте. Но как бы там ни было, успешное начало этого процесса во многом определялось поведением волка [7]. Продвигал же одомашнивание отбор, векторизованный на специфическое поведение.

В отсутствие других подходов к достоверной реконструкции ранних этапов domestikации особое значение приобретает экспериментальный подход. Эксперимент по domestikации лисиц был нацелен на то, чтобы проследить ранние стадии одомашнивания и попытаться выявить факторы, играющие в нем ключевую роль. Он был начат в середине 50-х гг. прошлого столетия. К тому времени лисица уже разводилась на промышленных зверофермах [10–12]. Это означает, что самый жесткий естественный отбор по поведению лисица уже прошла на стадии ее отлова и интродукции в неволю. Значительная часть из отловленных в природе лисиц гибла, а из выживших многие не давали приплода. Но тем не менее начиная с 30-х гг. в России уже были крупные лисьи фермы [10].

НАЧАЛЬНЫЙ ЭТАП ЭКСПЕРИМЕНТА

Наши наблюдения за поведением лисиц этих промышленных популяций выявили полиморфизм по их реагированию на человека [3, 13]: около 30% разводимых на зверофермах лисиц демонстрировали резко выраженную агрессивную реакцию на человека, 20% проявляли реакцию трусости, а у 40% проявления параметров трусливого поведения чередовались с проявлением параметров агрессии. Как показано Крушинским на собаках [14], реакции агрессии и трусости генетически не связаны. На основе наблюдений за поведением гибридов гилацких лаек с овчарками, а также гибридов волков с собаками он показал, что между этими реакциями существует тесное отрицательно-индукционное взаимодействие, в результате которого одна (более сильная) подавляет развитие и проявление другой (более слабой) [14]. По нашим наблюдениям, проведенным в период начала эксперимента со взрослыми лисицами зверосовхоза “Лесной” Алтайского края ($n > 500$), реакции агрессивности и трусости также отрицательно коррелируют ($R = -0.44$, неопубликованные собственные данные). Эти данные согласуются с данными Крушинского, полученными на

Таблица 1. Некоторые термины и их определение в настоящей статье

Термины	Определение
Древние собаки и волки	Животные, жившие от нескольких тысяч до нескольких десятков тысяч лет назад
“Древние” породы собак	Современные зарегистрированные породы, которые по результатам анализа ОНП или микросателлитов оказались ближе к основанию филогенетического дерева, что предполагает их близость к предковой популяции волка [64]
Деревенские собаки	Беспородные собаки, живущие в сельской местности рядом с человеком, питающиеся в основном остатками человеческой пищи, однако обычно не имеющие хозяина и избегающие контактов с человеком [17, 30–32, 36]
Коренные собаки	Беспородные собаки, предположительно представляющие “историческую” популяцию собак данного региона. Они обычно полностью зависимы от человека и имеют хозяина [40]

собаках. Однако в недавно опубликованной работе [15] приводится информация о положительной связи между фенотипической экспрессией агрессивности и трусости. Эта информация получена на основе анализа большого объема данных, взятых из опросников DMA (Dog Mentality Assessment) о поведении собак (более 76 тыс. особей, представителей 78 пород собак). С нашей точки зрения эти результаты трудно интерпретировать, поскольку трусливость и агрессивность отражают альтернативные стратегии поведения в ответ на средовые изменения. Одна стратегия – пассивная (избегание стрессорирующего стимула), другая – активная, направленная на борьбу со стрессорирующим воздействием [16]. Вероятно, дальнейшие экспериментальные исследования помогут прояснить, что же формирует в ходе развития положительную корреляцию между ними. Однако тестирование поведения африканских деревенских собак [17; табл. 1] свидетельствует скорее о наличии отрицательной корреляции между агрессивностью и трусостью – усиление проявлений агрессии у собак снижало проявление трусливого поведения.

Влияние отбора на особенности социального поведения. Качественные изменения в поведении

В протестированных нами промышленных популяциях только около 10% лисиц не проявляли на человека ярко выраженных реакций дикости – агрессии и трусости. Среди этих животных и были отобраны основатели экспериментальной популяции, селекционируемой на доместикационное поведение [18]. На первом этапе отбор шел на элиминацию из поведения лисиц агрессивно-трусливых реакций дикости. Для количественной оценки экспрессии агрессивных и трусливых реакций в ходе отбора использовалась разработанная нами балльная шкала, неоднократно описанная ранее [13, 18, 19]. Агрессивные реакции перестали проявляться уже после нескольких первых поколений прово-

димого жесткого отбора [19, 20]. Высказывается мнение, что агрессивное поведение исчезло слишком быстро в условиях нашего селекционного эксперимента [21]. Поэтому следует напомнить, какой путь прошла лисица от полувольного разведения в вольерных условиях первых звероводческих хозяйств до содержания в изолированных условиях индивидуальных клеток в период начала эксперимента [12, 22, 23]. Фактически отбор на толерантное отношение к человеку осуществлялся с самых ранних этапов развития звероводства. Есть основания полагать, что этот отбор был направлен не только на элиминацию агрессивных реакций, но и на снижение трусости по отношению к человеку.

Что касается используемой количественной оценки поведения и эффективности отбора по этой оценке – она неоднократно приводилась ранее [13, 18, 19]. В настоящем обзоре хотелось бы привлечь внимание к изменениям особенностей поведения и к тем уникальным свойствам поведения, которые не наблюдались у лисиц ранее по отношению к человеку и впервые начали возникать в ходе отбора на приручаемость. Так, в 4-м поколении впервые была зарегистрирована такая возникшая *de novo* реакция как повиливание хвостом [20]. Сначала она возникла в результате положительных тактильных воздействий со стороны человека, например поглаживание животных в раннем онтогенезе. При отборе на приручаемость повиливание хвостом было одним из поведенческих параметров, который наряду с другими играл роль селекционного критерия. В ходе отбора экспрессия этого параметра все более усиливалась. И в конце концов на определенном этапе физиологический порог для возникновения этой поведенческой реакции настолько снизился, что она начала возникать и проявляться уже при отсутствии средового воздействия, вызвавшего ее к жизни. Иными словами, произошло событие, которое Уоддингтон [24] в свое время назвал “генетической ассимиляцией”. Нужно подчеркнуть,

что у некоторых млекопитающих, в частности у волка и собаки, повиливание хвостом — многогранный признак, который используется в разных контекстах, связанных с демонстрацией различного настроения. У волка этот признак играет важную роль в формировании социальных связей между конспецификами в раннем онтогенезе. Однако домашняя собака с легкостью формирует социальные связи с представителем другого вида — человеком; эту особенность собак связывают с отбором на domestикацию [25]. И характерное влияние хвостом, свидетельствующее о аффилиативных намерениях собаки, играет при этом немаловажную роль [26]. Оно было описано еще Дарвином как составная часть модели поведения, которую собаки используют для выражения привязанности к человеку [27]. Вместе с этим поведенческим признаком у лисиц появились и другие качественные изменения в поведении: следование за человеком, конкуренция за его внимание, дифференциальная реакция на знакомого и незнакомого человека, проявление специфических голосовых реакций [20, 28, 29]. Все эти признаки предполагают их возможную связь с отбором на дружелюбное реагирование на человека и указывают на то, что этот отбор создал совершенно новую лисицу, с особенностями поведения, не проявлявшимися ранее на человека.

Уместно здесь напомнить работу Hansen Wheat et al. [15] на собаках, в которой показана отрицательная корреляция между признаками социального поведения (т.е. готовностью общаться с человеком) и “реактивными” признаками, к которым авторы относят агрессивность и трусливость, отражающие степень дикости. Принципиально важно, что эта отрицательная корреляция продемонстрирована авторами только для собак “древних” пород, сохранивших генетические черты близости с волками и не подверженных многовекторному отбору по многим признакам в процессе породообразования [15], т.е. для пород, чье поведение несет большой отпечаток ранних этапов исторического процесса domestикации (табл. 1).

ПОВЕДЕНИЕ АФРИКАНСКИХ ДЕРЕВЕНСКИХ СОБАК И “ДРЕВНЕЙ” ПОРОДЫ БАСЕНДЖИ

Некоторые параллели с разными этапами отбора лисиц прослеживаются у африканских деревенских бродячих собак и африканской “древней” породы басенджи. Эти два типа африканских собак могут отражать два этапа domestикации.

Следует отметить их филогенетическую близость по сравнению с европейскими и ближневосточными собаками и китайскими коренными собаками (табл. 1), установленную на основе анализа панелей однонуклеотидных полиморфизмов

(ОНП) [30] и данных ОНП, полученных при полногеномном секвенировании [31].

Деревенские собаки в основном живут поодиночке [32], в отличие от городских бродячих собак, которых как правило можно увидеть в группах [33, 34]. Деревенские собаки обычно не имеют хозяев, тогда как “древняя” порода басенджи полностью связана с человеком и ее используют в охоте [35]. По-видимому, деревенские собаки, в отличие от басенджи, не подвергались сознательному искусственному отбору по поведению [32, 36].

Африканские деревенские собаки и басенджи проявляют повышенную тревожность, в том числе при приближении незнакомого человека [17, 35]. Большинство деревенских собак убегают от экспериментатора и только около 4% подходят к нему [17]. Такое поведение во многом подобно поведению неселекционированных лисиц на зверофермах, которые не подвергались направленному отбору на приручаемость [3, 18, 20, 37–39]. По-видимому, неселекционированные лисицы находятся на самой ранней стадии domestикации (прото-domестикации), которая связана с началом существования рядом с человеком.

Басенджи уже полностью зависимы от человека, однако по сравнению с многими другими породами проявляют гораздо более тревожную реакцию на человека, на других собак и на несоциальные объекты (предметы). Они предпочитают пассивного человека активному [35]. Подобное трусливое поведение в вольере на фоне мотивации к более тесному общению с человеком мы наблюдаем у некоторых domestизируемых лисиц. Такие животные предпочитают прямому физическому контакту с человеком игру на расстоянии. Они стараются не подходить к руке экспериментатора, но бежать за ним и останавливаться в полуметре, ожидая продолжения игры.

Следует отметить, что басенджи, хотя и являются исторически domestизированными собаками, прошли гораздо меньший путь породной стандартизации, чем другие породы, так как были вывезены из Африки только в первой половине XX в., и в этом их до определенной степени можно сравнивать с лисицами. Басенджи в 5-недельном возрасте, в отличие от щенков других пород, в целом похожи по поведению на щенков дикого волка [35].

Однако, проводя сравнения африканских собак с другими породами и между собой, нужно иметь в виду, что как басенджи, так и африканские деревенские собаки имеют хоть и небольшую, но заметную по сравнению с многими другими породами собак примесь либо серого, либо африканского волка [31, 40, 41]. Гибридизация африканской деревенской собаки с африканским волком (*C. lupaster*) происходила, по-видимому, во время заселения собакой Африканского континента, т.е. около 5–14 тыс. лет назад [26]. Едва

ли этот факт серьезно влияет на их поведение, учитывая, что у многих базовых пород примесь генома волка повышена, однако он может серьезно изменить как их место на филогенетическом древе, так и оценку того, когда жил их общий с волком предок [40, 42].

Все вышесказанное предполагает общую природу изменений поведения собак в процессе их исторической доместикиации, а также лисиц в ходе селекционного эксперимента, которые согласно истории разведения и данным Statham et al. [43] прошли два этапа одомашнивания: первый (прото-доместикация) включает разведение в неволе в течение приблизительно 50 лет с бессознательным отбором по поведению; второй соответствует более чем 50 годам дополнительного интенсивного отбора на ручное поведение.

ОТБОР ПО ПОВЕДЕНИЮ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЛИСИЦ: ИСТОРИЯ И ДЕНЬ СЕГОДНЯШНИЙ

Все описанные выше изменения поведения лисиц возникли в ходе отбора на дружелюбное поведение, т.е. в направлении его действия. Поэтому они не были неожиданными и удивительными. Удивительным было то, что отбор лисиц на приручаемость привел, помимо изменения поведения, к возникновению некоторых морфологических новшеств, характер которых был очень сходен с морфологическими признаками, типичными для домашних собак. Это сходство наглядно иллюстрирует рис. 1.

Раньше других появились изменения стандартной серебристо-черной окраски. Так, в 9-м поколении отбора (1969 г.) в разных семьях родились первые три щенка с белой отметиной на голове, так называемой “звездочкой” (рис. 1,б). Впоследствии “звездочки” многократно возникали *de novo* в различных семьях. В последующие 10 поколений (1970–1979) частота появления этого маркера среди доместицируемых лисиц варьировала от одного до девяти на каждую тысячу потомков (1.1×10^{-3} – 9.4×10^{-3}). В период с 1991 г. по настоящее время частота этого изменения увеличилась на два порядка; в среднем один из каждого десятка щенков имел белую отметину на голове; а в последующем в каждом десятке потомков насчитывалось уже несколько носителей гена Star. Причем проведенный генетический анализ показал тесное сцепление этой абберрации с другой, также вызванной отбором лисиц на доместикиацию, — “подпалами”, или появлением на фоне серебристо-черной окраски осветленных желто-бурых пятен [44].

Другой признак — висячие уши, также был одним из первых доместикационных изменений. В

норме у всех недоместицируемых лисят уши принимают вертикальное положение в возрасте двух–трех недель, у ручных — несколько позднее, но и у них к 4-недельному возрасту уши принимают стоячее положение. Однако в 1969 г., т.е. с девятого поколения отбора появляются ручные потомки, у которых уши остаются опущенными в течение первого месяца жизни. Они “встают” в двух-, а редко — в трехмесячном возрасте (рис. 1,в), еще реже этот признак сохраняется всю жизнь. После рождения в 9-м поколении (1969 г.) первого “вислоухого” лисенка за период 1970–1979 гг. было зарегистрировано 22 таких абберранта. Появлялись они с частотой 10^{-3} – 10^{-4} , т.е. в среднем один потомок на каждую тысячу или реже. Эта частота почти не изменялась во все последующие годы.

У щенков более поздних поколений отбора появился такой признак, как манера держать хвост свернутым в кольцо или полукольцо (рис. 1,г). В норме у лисицы хвост опущен вниз (рис. 1,а). У некоторых ручных лисиц в возрасте 2–3 мес. либо к 6–7 мес. проявляется способность держать хвост свернутым в кольцо или полукольцо (“лаечный хвост”). Некоторые из таких лисиц держат хвост свернутым постоянно, но большинство — только при эмоционально-положительных состояниях (например, при виде человека или в ожидании кормления). Этот признак впервые появился позднее описанных выше — в 1973 г. С 1973 по 1979 г. в среднем из каждого десятка ручных животных один был абберрантным (1×10^{-1} – 1.4×10^{-1}). В настоящее время частота возникновения этого признака колеблется в пределах от 2×10^{-2} до 5×10^{-2} .

В 15-м поколении отбора (1975 г.) впервые была зарегистрирована такая абберрация как укороченный за счет уменьшения числа хвостовых позвонков хвост (рис. 1,д). Впоследствии такие щенки появлялись не в каждом поколении, их частота за весь период эксперимента составляет менее 1×10^{-3} . Нумерация поколений отбора велась по годам рождения животных, что у лисицы не отражает количества строгих генетических поколений.

Практически все из перечисленных выше признаков характерны для многих исторически одомашненных видов. Однако из всех морфологических изменений особое значение придают изменениям краниальных признаков [45–47]. Отдельные изменения в размерах и пропорциях черепа служат маркерами для дифференцирования археологических остатков собак и волков. К таким признакам относят: уменьшение размера черепа у собак по сравнению с волком [47–49]; редукцию длины и ширины “хищных зубов”, считающуюся многими авторами четким сигналом одомашнивания [50–53]; скученность зубов у собак [54, 55]; сохранение некоторых ювенильных пропорций у собак [8, 56]. Более “массивная” (вы-



Рис. 1. Некоторые фенотипические изменения, возникшие в доместизируемой популяции лисиц и гомологичные фенотипам, характерным для домашних животных. *а* – лисица стандартного фенотипа; *б* – специфически локализованное на голове белое пятно (“звездочка”), контролируемое у лисицы аутосомным полудоминантным геном – Star (слева – лисица, гетерозиготная по гену Star, справа – собака с гомологичным белым пятном на голове); *в*: слева – лисенок в возрасте одного месяца с висячими ушами, справа – собака с гомологичным положением ушей; *г*: слева – ручная лисица с завернутым в кольцо хвостом, справа – лайка; *д* – ручная лисица (слева) и собака (справа) с укороченным за счет уменьшения числа позвонков хвостом; *е* – ручная лисица (слева) и собака (справа) с удлиненной нижней челюстью – “перекус”; *ж* – взрослая ручная лисица, имеющая две аберрации: слева – “звезда” на голове и завернутый в кольцо хвост, справа – “звезда” на голове и висящее ухо.

сокая и широкая) нижняя челюсть была описана у некоторых доисторических канид, которые были идентифицированы как собаки [9, 50]. Многие из перечисленных краниологических признаков, наблюдаемых у древних собак, в последнее время подвергаются критическому пересмотру на предмет их связи с самым ранним периодом одомашнивания [57; табл. 1]. Недостатками сравнительных

исследований древних собак и волков являются дефицит образцов древних волков и сравнение в некоторых случаях древних собак с современными волками. Экспериментальные ручные лисицы, как уже обсуждалось выше, могут рассматриваться в качестве модели раннего периода одомашнивания, соответствующего началу сознательного отбора животных на свойства поведения. Поэто-

му регистрируемые у них изменения, в частности морфологических признаков, могут дать информацию о связи этих признаков с отбором по поведению.

Изменения некоторых краниологических параметров, определяющих форму черепа, в частности укорочение его лицевого отдела, были отмечены у лисиц в ходе отбора. Статистически значимое укорочение некоторых элементов лицевого черепа было выявлено у ручных лисиц на ранних этапах эксперимента, а у самцов – также его расширение [58]. Нельзя не отметить такую aberrацию как удлинение нижней челюсти (“перекусы” – рис. 1,е). Этот признак впервые начал возникать на более поздних этапах отбора, частота его появления *de novo* в разные годы колеблется в пределах 10^{-2} – 10^{-3} . Крайне важно, что у ручных лисиц обнаружена также редукция длины и ширины “хищных зубов” – четвертого верхнего премоляра (P4) и первого нижнего моляра (M1) [59], что также считается одним из характерных изменений, отмечаемых у таких исторически одомашненных видов, как свиньи и собаки, считающихся “вершиной доместикиации” [60].

Еще одной особенностью морфологических изменений является то, что они возникают в различных неродственных семьях, как правило далеко продвинутых селекционным процессом по степени доместикиации, и тесно коррелируют в своем возникновении. В одном и том же помете стандартных родителей рождаются щенки с разными отклонениями от нормы, или у одного и того же животного возникает целый комплекс изменений (рис. 1,ж). Часто от родителей, несущих тот или иной морфологический признак, появляются потомки с совсем другими признаками, что трудно интерпретировать исходя из того, что в основе каждой фенотипической aberrации лежат специфические генетические изменения. Скорее это указывает на их общую генетическую природу и на участие в их контроле генов с широким плейотропным эффектом.

Совокупность фенотипических признаков, как морфологических, так и признаков поведения, проявляющихся в ходе одомашнивания у многих видов животных, в первую очередь у собак, и отличающую их от диких предков, называют “доместикационным синдромом” (ДС) [61]. Однако не все признаки ДС проявляются у всех доместицированных видов. На этом основании высказывается альтернативная точка зрения, что поскольку не существует универсального набора признаков для всех доместикатов значит не существует общей биологической основы для их возникновения и нельзя рассматривать их появление в результате одомашнивания [21, 62]. Такая точка зрения представляется нам необоснованной.

Онтогенетические процессы – это крайне сложная система нейрогормональных и нейротрансмиттерных регуляторных взаимодействий, имеющих видовые особенности. Поэтому нет ничего удивительного в отсутствии полного набора всех признаков у всех одомашненных видов. Но, несмотря на критику некоторыми авторами отсутствия универсальности в проявлении признаков ДС, принципиальное значение имеет тот факт, что какой бы набор признаков ни проявлялся у того или иного вида приручаемость (“tameness”) как основной признак ДС признается всеми.

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ФИЛОГЕОГРАФИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ДОМСТИКАЦИИ СОБАКИ

Прежде чем перейти к обсуждению молекулярно-генетических механизмов доместикиации, рассмотрим современные представления о процессе доместикиации собаки с точки зрения филогенетики и филогеографии. На его примере можно наиболее полно охарактеризовать имеющиеся стратегии формирования выборок для исследования и спектр молекулярно-генетических методов их анализа. Только использование и совершенствование корректных подходов позволяет получать молекулярно-генетические результаты, выявляющие параллельные механизмы исторического одомашнивания собаки и экспериментальной доместикиации лисиц.

Начиная с ранних работ и по настоящее время в качестве основных объектов популяционно-генетического исследования при реконструкции процессов доместикиации выступают современные популяции собак (*C. familiaris*) и их предполагаемый дикий прародитель серый волк (*C. lupus*). Современные собаки являются наиболее доступным материалом для исследования. Высокое разнообразие групп современных собак ставит проблему формирования выборок, наиболее адекватных для реконструкции различных этапов одомашнивания собаки. Большинство современных пород имеют недавнюю историю создания, связанную с прохождением через жесткое бутылочное горлышко в процессе строжайшего искусственного многовекторного отбора [63]. В результате они утратили существенную долю имевшегося генетического разнообразия и особенности структуры генофонда, которые сформировались на более ранних этапах доместикиации. Поэтому представители современных пород являются не самым информативным объектом для реконструкции ранних этапов доместикиации. Впрочем, выборки, охватывающие большое число пород различного географического происхождения, сохраняют свое значение [64, 65]. При этом представители современных пород, безусловно, представляют

собой модель для изучения молекулярно-генетической природы уникальной фенотипической вариативности современных пород собак, сопоставимой по некоторым параметрам с фенотипической вариативностью в пределах всего семейства собачьих [65].

Необходимость включения в выборки современных собак, более близких к отдаленным предкам по структуре генофонда, привела к активному использованию нескольких категорий собак, не относящихся к кругу представителей современных пород. К их числу относятся так называемые “древние” породы собак из различных регионов, продемонстрировавшие наибольшую филогенетическую близость к волку при проведении геномных исследований, такие как акита, басенджи, маламут, сибирская хаски, чау-чау [40, 64]. К этим критериям также подходят беспородные коренные и бродячие деревенские собаки. Последние, возможно, напрямую происходят от ранних собак, лишь отчасти зависимых от человека [66]. По мнению ряда исследователей, существует вероятность, что деревенские собаки никогда не имели хозяина и не подвергались осознанному и направленному искусственному отбору [32, 36], а их геном может дать представление о геноме ранних собак [67, 68]. Следует отметить, что не все исследователи согласны с этими предположениями [40, 69]. Существует вероятность, что их филогенетическое положение обусловлено не сохранением древних черт структуры генофонда, а поздней гибридизацией с волком [40]. Активно привлекаются к популяционно-генетическим исследованиям собак и феральные (вторично одичавшие) группы, такие как динго и поющие собаки Новой Гвинеи [70]. Таким образом, общей тенденцией развития стратегий формирования выборок современных собак при реконструкции доместикации методами популяционной генетики является включение в выборки групп, потенциально сохранивших сходство с давними предками, и некоторое снижение роли современных пород, хотя не все исследователи согласны с такой стратегией [64].

Помимо современных собак реконструкция популяционно-генетических событий доместикации собак подразумевает включение образцов из современных популяций волка (*C. lupus*), для их последующего сравнительного анализа с собаками. Стратегия формирования выборки волков для исследования, на наш взгляд, должна подразумевать максимально возможный охват их филогеографического разнообразия. Возможны и другие стратегии, такие как включение в исследование волков только из регионов потенциальной локализации центров доместикации собак [70]. Одним из аргументов в пользу максимально возможного учета филогеографического разнообразия современных популяций волков является необходимость оценки влияния повторных скрещиваний доместичи-

рованных собак с локальными популяциями волков, которые могли происходить существенно позже ранних стадий их доместикации [66]. В этой связи, вероятно, следует учитывать и близость мест обитания волков к человеческим поселениям, вплоть до синантропизма [71], что является важным фактором не только возможных скрещиваний с собакой, но также влияния относительно недавнего или современного естественного и искусственного отбора, который может существенно влиять на результаты исследований механизмов доместикации.

Важнейшую категорию материалов, имеющих потенциально высокую информативность для реконструкции всех этапов доместикации, составляют останки собак и волков различного возраста. Особый уровень значимости для реконструкции процессов доместикации собак палеозоологические материалы получили с развитием методов палеогенетики, которые позволили использовать их для проведения молекулярно-генетических исследований наряду с образцами из современных популяций [41, 67, 72, 73]. Очевидно, что для реконструкции истории доместикации собаки наибольший интерес представляют останки ранних собак, происходящие с территории потенциальных центров их доместикации. Однако именно для этих материалов возникают наибольшие сложности с достоверной идентификацией их принадлежности ранним собакам или волкам исключительно по морфологическим особенностям скелета [74–76]. Для такого рода позднеплейстоценовых материалов необходимо комплексное исследование на предмет филогенетического положения. Например, филогенетическое положение некоторых позднеплейстоценовых образцов с территории Европы, отнесенных по морфологическим критериям к ранним собакам [77, 78], вызывает большие возражения [74, 75, 79]. Предметом научной дискуссии также является принадлежность палеолитических останков, обнаруженных на территории Сибири [80], ранней доместичированной собаке [41, 74, 75, 77, 79, 80]. Наибольший возраст останков, принадлежность которых ранним собакам на данный момент не вызывает сомнений, для различных регионов составляет: в Европе – почти 15 тыс. лет [48], на Ближнем Востоке – около 13 тыс. лет [81], в Восточной Азии – не более 12–13 тыс. лет [82], в частности на юге Китая – около 7 тыс. лет [83, 84]. Палеогенетические исследования останков собак, относящихся к более поздним периодам, также представляют несомненный интерес [67, 84, 85]. Самый эффективный подход – это охват выборкой всех имеющихся для исследуемого региона разновременных останков собак. Эти же соображения справедливы и для останков представителей древних популяций серого волка. Более того, для оценки степени дивергенции попу-

ляций плейстоценовых волков и поиска наиболее вероятного источника доместикиации собак среди локальных популяций волка из различных регионов имеет смысл исследование ДНК из останков волков, возраст которых заведомо превышает начало доместикиации [86, 87].

Помимо стратегии формирования выборок ключевым фактором эффективности исследования является выбор анализируемых молекулярно-генетических маркеров. Общая тенденция состоит в переходе от анализа отдельных филогенетически и филогеографически информативных маркеров (как правило, маркеры с однородительским типом наследования – мтДНК и Y-хромосома) к расширенному спектру маркеров, вплоть до полногеномного анализа [41, 88]. Эта тенденция касается и современных и древних материалов. При этом следует подчеркнуть, что все перечисленные стратегии сохраняют свои области применения до настоящего времени, хотя основные перспективы связаны именно с широким применением высокопроизводительных методов полногеномного анализа [41, 73]. Сдерживающим фактором в их применении служит лишь уровень развития методов корректной интерпретации большого объема геномных данных.

Несмотря на большой объем уже проведенных популяционно-генетических и геномных исследований, к настоящему моменту удалось однозначно ответить лишь на часть вопросов, связанных с доместикиацией собак. Генетическими данными было подтверждено, что диким прародителем домашней собаки являлся волк [70]. При этом остается спорным вопрос филогенетических отношений собак и современных популяций волков. Существуют данные, указывающие на то, что собаки ведут свое происхождение от ныне вымершей популяции плейстоценовых волков, не являющихся также прямыми предками современных волков [41, 70, 82]. Поэтому некоторые результаты сравнения современных собак с современными дикими волками могут искажаться в связи с различиями популяций плейстоценовых волков, от которых они дивергировали [70, 89]. Однако есть исследования, доказывающие возможность происхождения современных собак и волков от общей популяции плейстоценового волка [40, 90]. Еще одним общепризнанным результатом стало доказательство отсутствия участия других предшественников семейства собачьих, помимо волка, в ранних этапах возникновения собак [41, 88].

Однако по целому ряду вопросов, имеющих ключевое значение для объективной реконструкции процесса доместикиации собак, генетические данные пока не позволили получить однозначных ответов. К таким вопросам относится датировка начала процессов доместикиации собак. Имеющаяся совокупность генетических данных указывает, что

дивергенция собаки и волка произошла в позднем плейстоцене, в очень широких хронологических рамках – от 11 до почти 40 тыс. лет (по некоторым оценкам – от 15 до 33 тыс. лет назад) [40, 41, 67, 70, 86]. Размытость хронологических оценок, полученных на основании генетических данных, обусловлена как широким разбросом оценок скорости накопления мутаций, так и сложностями вклада повторных скрещиваний собак с волком уже после их дивергенции [42]. Тем не менее генетические и палеогенетические данные независимо подтвердили, что начало процессов доместикиации собаки связано с деятельностью охотников-собирателей и предшествует возникновению животноводства и земледелия [41].

Значительная неопределенность сохраняется и в вопросе географической локализации центра доместикиации собаки, и даже числа таких центров. За последние два десятилетия на основе накопленных молекулярно-генетических данных были высказаны предположения о локализации основного центра доместикиации собаки на юге Восточной Азии [40, 89, 91, 92], в Европе [93], на Ближнем Востоке [94] и в Центральной Азии [95], также о наличии независимых центров доместикиации в разных регионах Евразии [82].

Наиболее полно обоснованным является существование центра доместикиации собак в Юго-Восточной Азии – на юге Китая [40, 89, 91, 92] и, вероятно, в сопредельных регионах [84]. Наличие этого азиатского центра доместикиации было последовательно продемонстрировано на уровне генофонда митохондриальной ДНК [89, 91], Y-хромосомы [92] и полногеномных исследований [40]. Согласно имеющейся точке зрения собаки были доместичированы в Юго-Восточной Азии порядка 16–33 тыс. лет назад, а затем, начиная ~ с 15 тыс. лет назад, распространились из этого региона на другие территории Евразии [40]. На наш взгляд, высока вероятность также и другого сценария, который подразумевает существование независимых центров дивергенции собак от плейстоценовых волков как на востоке, так и на западе Евразии (на территории Европы) [82]. При этом сценарии также происходит распространение собак восточного происхождения в западные области Евразии. В результате ранние местные собаки Европы, имеющие верхнепалеолитическое происхождение, были вытеснены пришлыми собаками восточного происхождения. Распространение собак с востока на запад шло по югу Евразии через Западную Азию и Ближний Восток [82, 96]. Подтверждением справедливости этой модели может быть смена генетического состава собак Европы, произошедшая в неолите, которая зафиксирована по палеогенетическим данным о генофонде мтДНК, вероятно связанная с “неолитической революцией” – процессом распространения на территорию Европы носителей навыков земледелия

лия и животноводства с территории Ближнего Востока [85]. Следует отметить, что не все исследования подтверждают справедливость данной модели [67]. Для дальнейшей проверки описанного сценария необходимо накопление большего количества данных, в первую очередь палеогеномных, о разновременных группах древних собак с территории различных регионов Евразии, в первую очередь из предполагаемых ранних центров доместикиции. Работы, проводимые в данном направлении, уже позволяют уточнять модели различных этапов доместикиции собаки [41]. Основной проблемой при этом является неравномерная исследованность материалов из различных потенциальных центров доместикиции собаки. Накопление таких палеогенетических данных уже идет опережающими темпами для Европы [41, 67, 85], Ближнего Востока и Северной Азии (Сибири) [41], по сравнению с Южной Азией. Это связано с различной доступностью адекватного палеозоологического материала для исследования в силу того, что территория Европы более подробно исследована археологически. Кроме того, перспективы получения большого объема палеогеномных данных из материалов с юга Китая и из сопредельных регионов сталкиваются с проблемой плохой сохранности ДНК в костных останках в региональных климатических условиях. Тем не менее опубликованы первые палеогенетические данные о древних собаках из южной части Китая на уровне митохондриальной ДНК [84].

Существование одного основного центра доместикиции собаки является приоритетной точкой зрения, находящей все новые подтверждения [41]. При этом гипотезы о важной роли других предполагаемых ранних центров доместикиции собаки, например на территории Ближнего Востока [94] или Центральной Азии, пока не получили достаточного подтверждения. Возможно, для решения этого вопроса принципиальное значение имеет высокий уровень генетического разнообразия собак в позднем плейстоцене, подтверждаемый палеогеномными данными [41]. Однако следует отметить, что вопрос о численности и географической локализации центров ранней доместикиции собаки остается открытым.

С различной степенью достоверности реконструирована пока и генетическая история отдельных групп собак. Например, возникновение специфических групп собак, населяющих арктические широты, в частности предков современных ездовых собак Арктики, связано с проникновением в этот регион собак из более южных регионов Азии в финальном плейстоцене, сопровождавшимся их гибридизацией с локальными популяциями позднеплейстоценовых волков [86, 87].

Таким образом, генетические исследования позволили предварительно реконструировать наиболее вероятные сценарии доместикиции собаки и их распространения по планете. Дальнейший прогресс в данной области может быть связан с исследованием различных групп современных собак, не охваченных анализом до настоящего времени [84], а также с углубленным исследованием современных собак и волков из различных регионов на полногеномном уровне. Большое значение могут иметь глобальные программы изучения генетического разнообразия собак в планетарном масштабе, которые реализуются в настоящее время, например проводимое с 2019 г. секвенирование 10 тыс. геномов современных собак и волков из всех регионов их обитания [65]. Обязательным условием прогресса в объективной реконструкции истории доместикиции собаки в глобальном масштабе и на уровне отдельных регионов будет накопление значительных новых объемов геномных данных в рамках палеогенетического подхода (см. например, [41]).

ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ ДОМСТИКАЦИИ

Исследования молекулярно-генетических механизмов доместикиции собаки и, в первую очередь, коренных изменений поведения, составляющих приручаемость, предпринимались на протяжении довольно продолжительного времени. Использование современных возможностей параллельного полногеномного секвенирования открывает новые перспективы. Однако следует учитывать, что недостаточно хорошо аннотированный геном собаки не может дать столько же результатов, сколько геном человека.

На протяжении последнего десятилетия опубликован ряд работ посвященных доместикиции собаки, где были исследованы геномы собак различных пород, а также деревенские и коренные собаки и волки [36, 40, 68, 70, 73, 84, 94, 97–102]. Основные результаты относятся к выявленным участкам генома, на которые, по-видимому, оказывал давление отбор. Существенная часть генов, локализованных в этих участках, относится по терминам геномной онтологии (*gene ontology*; GO) к функционированию нервной системы и поведению, хотя значительная часть также играет роль в метаболизме или размножении.

К сожалению, совпадение результатов этих исследований небольшое, что связано, по-видимому, с несколькими причинами. Так, при составлении выборки Akey et al. [97] использовали только породы собак (без волков), в работе vonHoldt et al. [94] “древние” породы не превышали 20% выборки, а волки — менее 10%. Однако уже в работах Li et al. [99], Wang et al. [40, 100], Freedman et al. [102]

выборки были обогащены “древними” породами и коренными (особенно китайскими) беспородными собаками, а также образцами собаки динго и поющей гвинейской собаки. Наиболее решительный шаг в направлении очистки результатов от наслоений, не связанных с ранней доместикацией, был сделан Pendleton et al. [68]. Исследователи использовали выборку волков из Америки и Евразии, сравнили ее с выборкой деревенских и коренных собак со всего мира: из Европы, Азии, с Ближнего Востока, Южной и Юго-Восточной Азии. Выявленные регионы влияния отбора были дополнительно проверены с учетом данных о гаплотипах собак, живших 5–7 тыс. лет назад в Ирландии и Германии. Благодаря последнему этапу обработки данных из анализа были удалены многие участки, пересекающиеся с другими исследованиями, такими как Axelsson et al. [98] и Sagan, Blass [101]. Несмотря на несомненную прогрессивность этого подхода, следует отметить, что чрезмерная обогащенность выборки феральными (динго, поющая гвинейская) и деревенскими собаками может вносить свои погрешности. Так, показано, что собака динго прошла определенный отбор на ферализацию и, по-видимому, имеет участки генома, на которые было оказано давление этим отбором [103]. По данным глубоких поведенческих исследований, африканские деревенские собаки скорее относятся к этапу доместикиции, близкому к прото-доместикиции [17, 35]. И если они действительно никогда не имели хозяев и не подвергались направленному отбору [32, 36], в том числе и по поведению, то значит у них и нет части важных для истинно доместицированной собаки изменений генома. Как уже сказано выше, их скорее можно сравнить с неселекционированной популяцией лисиц, разводимых на фермах. Более правильным нам представляется увеличение в выборке числа собак, подобных китайским коренным [40]. Хотя нам не известен подробный поведенческий анализ этих собак, но, согласно описанию, они, как правило, живут в крестьянских семьях и полностью зависимы от человека, а значит полностью прошли этап доместикиции, предполагающий наличие сознательного или бессознательного искусственного отбора по поведению. Вероятно, они подходят для полногеномных исследований лучше, чем басенджи, так как, по-видимому, не были гибридизированы с волками [40].

Важную роль в малом совпадении результатов различных исследований, по-видимому, играли также подходы к обработке результатов. Например, в работах Sagan, Blass [101], Freedman et al. [102] и Pendleton et al. [68] с помощью математического моделирования определяли (а не устанавливали произвольно, как во многих других исследованиях) пороговое значение, при котором могла возникнуть статистически достоверная ге-

нетическая дифференциация популяции (F_{st}) по участку генома под воздействием нейтральной эволюции. При этом использовали данные о демографической истории той или иной породы, учитывая изменения ее численности. Включение демографической истории в анализ результатов полногеномного секвенирования не только понизило число ложноположительных результатов, но и расширило набор генов-кандидатов, относящихся к функционированию нервной системы и поведению. Так, в работе Freedman et al. [102] из 349 регионов, по-видимому подвергнутых отбору, первые 100 регионов часто содержали гены-кандидаты, связанные, согласно GO, с работой мозга и поведением. К ним, в частности, относятся гены основного белка миелина (*MBP*) и ионотропного каинатного рецептора глутамата 3 (*GRIK3*).

Участок генома, где локализован ген *MBP*, является как подвергнутый положительному отбору сразу в нескольких исследованиях [98, 101, 102]. На этот факт следует обратить внимание, потому что миелинизация аксонов в гиппокампе и префронтальной коре играет ключевую роль как в передаче сигнала в нейронах, так и в обучении и формировании памяти [104–107].

Не менее интересным является ген *GRIK3*. Он выявлен как ген-кандидат в нескольких исследованиях доместикиции собаки [68, 102, 108, 109]. Следует отметить, что гены глутаматных рецепторов, как ионотропных, так и метаботропных, по-видимому с достоверно большей частотой, чем другие гены вообще и гены других нейротрансмиттерных рецепторов в частности, выявляются в качестве мишеней доместикиции в различных исследованиях [109, 110]. У экспериментально доместицированных лисиц также выявлены участки предполагаемого давления отбора, которые содержат гены глутаматных рецепторов [102]. Сильным геном-кандидатом, чья локализация пересекается с поведенческим локусом количественных признаков на 15-й хромосоме, является *SORCS1*, кодирующий основной транспортный белок для ионотропных АМРА-рецепторов глутамата [111].

Тем не менее разными исследователями выявлены также гены-кандидаты серотониновых, дофаминовых и ГАМК-рецепторов и гены их транспортеров из семейства SLC6 [68, 94, 100, 101]. Это относится к доместикиции как собак, так и других животных, включая лисицу и человека [108–112]. Однако заметное преобладание генов глутаматных рецепторов указывает на их возможную ключевую роль при доместикиции [110].

Таким образом, можно предположить, что глутаматные рецепторы и их сигнальная система играют важную роль в доместикиции, и именно их изменение при отборе снижает стресс и тревожность. Однако важно отметить, что как у собак,

так и у других животных и человека глутаматные рецепторы изменяются в сторону большей, а не меньшей экспрессии при domestикации [109, 110, 112]. Так, в префронтальной коре domestизируемых лисиц метод RNA-seq показал повышенную экспрессию генов сигнального пути ионотропного глутаматного NMDA-рецептора 2D (*GRIN2D*, *ITPR3*, *ADCY7*) [112]. Поскольку глутамат является возбуждающим нейротрансмиттером, возникает кажущееся противоречие между профилем экспрессии глутаматных рецепторов и пониженным стресс-ответом, характерным для domestизированных животных [109]. Оно усугубляется практически полным отсутствием генов-кандидатов, напрямую связанных с гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системой (ГГНС), конечное звено которой, глюкокортикоидные гормоны, вызывают стресс-ответ в организме. Это противоречие Li et al. [109] пытаются решить через модификацию гипотезы, описывающей начальные этапы domestикации. Согласно Li et al. снижение тревожности происходило не через ослабление активности ГГНС, а через улучшение контекстуальной памяти на фоне стресса, обусловленной повышенной глутаматной сигнализацией у предков собак по сравнению с другими волками. Поскольку человек не представлял опасности для животного, то через процесс обучения оно быстро становилось менее тревожным и получало преимущество в освоении новой ниши, питания и размножении [109].

Такое объяснение кажется нам, по крайней мере, заслуживающим внимания, однако роль глутаматной сигнальной системы в ранней domestикации представляется гораздо более многогранной [110]. Глутаматные рецепторы могут быть как постсинаптическими, так и пресинаптическими. В последнем случае они будут способствовать обратному захвату глутамата, а значит ослаблению активности ГГНС [113]. Улучшение формирования памяти, зависящее от стрессорного выброса глутамата, происходит лишь при умеренном стрессе и не слишком высоких количествах глутамата. При сильном стрессе высокие концентрации глутамата вызывают нейротоксическую реакцию [114]. Есть прямые физиологические исследования адренал-эктомированных животных, свидетельствующие об участии ионотропных глутаматных рецепторов в глюкокортикоидной отрицательной обратной связи [115, 116]. Известно также, что метаботропные глутаматные рецепторы стимулируют высвобождение окситоцина и аргинин-вазопрессина, которые не только регулируют активность ГГНС, но и играют существенную роль в формировании социального поведения. Кроме того, есть ряд указаний, что окситоцин и аргинин-вазопрессин могут играть важную роль в domestикации [117–119]. Ген аргинин-вазопрессина *AVP* расположен в регионе генома лисы, который предположительно подвергался давлению отбора [111, Suppl. 7]. Со-

гласно геному собаки (GenBank: NC_006606.3), этот же регион генома лисицы также содержит неаннотированный ген окситоцина *OXT*, лежащий на расстоянии 8557 пн от гена *AVP*. Кроме того, важно отметить, что максимум экспрессии глутаматных рецепторов приходится на поздний эмбриональный и ранний постнатальный периоды [110], когда происходит формирование мозга, активный нейrogenез. Именно в этот период могут закладываться важнейшие морфофункциональные особенности мозга, играющие важную роль в регуляции социального поведения [120].

Следует отметить, что геномные исследования в основном ограничиваются белок-кодирующими генами, не рассматривая регуляторных участков. При сравнении метиломов волков и собак установлено 68 дифференциально метилированных сайтов, среди которых также обнаружен регуляторный участок гена везикулярного глутаматного транспортера 3 (*SLC17A8*) [121], хотя приведенные данные буккальных клеток позволяют лишь осторожно судить об изменениях метилирования ДНК в мозге. В гиппокампе ручных и агрессивных лисиц обнаружено 40 дифференциально метилированных регионов, в окрестностях которых обнаружены гены глутаматного рецептора (*GRIN3B*) и аденилатциклазы 7 (*ADCY7*) (неопубликованные данные), о повышенной экспрессии последнего в префронтальной коре domestизируемых лисиц указывалось выше [112].

Согласно приведенным данным, гены глутаматных рецепторов, являющиеся генами-кандидатами по результатам полногеномных и транскриптомных исследований domestикации собаки, лисиц и других животных и человека, могут быть одними из основных мишеней отбора. Имея широкий плейотропный эффект, они вызывают изменения в поведении и физиологических ответах взрослого организма и оказывают многогранное действие на развитие мозга.

Гены, связанные с адаптацией к новой нише

По мнению некоторых исследователей, исторический процесс domestикации собаки должен рассматриваться не столько в свете изменений поведения, сколько с позиции адаптации к диете как одного из самых сильных признаков, отличающих собаку от волка и позволивших предку собаки войти в новую нишу, которую создал человек [21]. При этом они ссылаются на одно из первых полногеномных исследований domestикации собаки [98].

В этой работе был выявлен важный механизм адаптации собак к человеческой пище, обогащенной крахмалом. Геном современных пород собак содержал дубликации гена расщепляющего крахмал фермента α -амилазы (*AMY2B*) по сравнению с геномом современных волков. У собак

была обнаружена увеличенная экспрессия этого гена и повышенная ферментативная активность [98]. Кроме того, гены двух других белков, участвующих в расщеплении крахмала, *MGAM* и *SGLT1*, по-видимому, также попали под давление отбора при доместикации [98, 100]. Это открытие позволило авторам предположить, что именно эта адаптация могла стать решающим шагом и движущей силой в раннем этапе доместикации собаки. Это также подтверждало гипотезу о важности для доместикации новой созданной человеком ниши и накопления остатков пищи вокруг человеческих поселений. Развитие сельского хозяйства могло ускорить одомашнивание собаки [98].

Однако сделанные выводы могли соответствовать лишь самым поздним границам начала доместикации — около 11 тыс. лет до наст.вр. [70], так как по современным данным возникновение земледелия приходится на 10000–12000 лет до наст.вр. [122], хотя уже во время последнего ледникового максимума (19000–26000 лет до наст.вр.) человек стал больше потреблять растительной пищи [123]. Предполагается, что собаки были доместичированы значительно раньше других животных в среде охотников и собирателей, чья пища еще не была обогащена крахмалом [70].

Был проведен ряд дополнительных исследований, в которые были включены собаки и волки из разных регионов, в том числе “древние” породы современных собак и образцы древней ДНК археологических находок [67, 70, 87, 124, 125]. Эти исследования показали, что экспансия гена *AMY2B* зависит от региона, указывая на динамичность истории адаптации собаки к различным условиям. Так, представители “древней” породы салюки, происходящей из Плодородного полумесяца, имеют 29 копий гена, а ездовые собаки (гренландские, аляскинский маламут, аляскинская и сибирская хаски), ведущие свою историю от арктических охотников-собирателей, имеют лишь 3–4 копии гена. У собаки динго обнаружено две копии *AMY2B*, тогда как у волков, как было установлено, его количество варьирует и может быть более двух [70, 87, 124, 125]. Гаплотип *MGAM* ездовых собак является предковым и с высокой частотой встречается у современных волков [87]. Не было обнаружено более 2–3 копий *AMY2B* и в древней ДНК четырех собак, найденных в разных регионах мира (в Италии, Ирландии, Германии и России), возрастом от 4700 до 9500 лет до н.в. [67, 87].

Таким образом, изменение генов, связанных с расщеплением крахмала, не связано с ранним этапом доместикации собаки, а относится к периоду развития сельского хозяйства [70]. Освоение новой ниши, созданной человеком, в первую очередь было для предка собаки связано с коренным изменением поведения, что и являлось решающим шагом и движущей силой доместикации [3, 19, 81,

126]. Однако адаптация к изменению диеты, вероятно, могла происходить вместе с изменением образа жизни в направлении, более соответствующем одомашниванию собаки в среде охотников-собирателей. На это указывают Freedman et al. [70], обнаружившие вместе с изменениями в генах, связанных с функционированием мозга, влияние доместикации на гены, играющие роль в метаболизме липидов (*NOCT*, *SCP2D1* и *PDXDC1*).

Гены клеток нервного гребня

Ряд новых генов-кандидатов были выявлены в исследовании Pendleton et al. [68] благодаря новому подходу к составлению выборки, обогащенной коренными породами и деревенскими собаками, а также использованию при анализе данных о демографической истории образцов и информации о гаплотипах собак, живших 5–7 тыс. лет назад. Многие из этих генов экспрессируются в клетках нервного гребня, связаны с функционированием нервной системы или участвуют в передаче сигналов ретиноевой кислоты. Эти результаты поддерживают гипотезу “нервного гребня”, объясняющую возникновение ДС нарушением миграции клеток из нервного гребня в различные органы и структуры организма при раннем эмбриогенезе [61].

Среди генов-кандидатов выявлены члены семейства *WNT*, играющие важную роль в миграции и дифференцировке клеток нервного гребня, а также других процессах, включая поведение [68]. У доместичируемых лисиц по сравнению с агрессивными также были выявлены достоверные различия в частоте аллелей генов этого семейства, *WNT3* и *WNT4* [112].

Миграция клеток нервного гребня происходит по градиенту ретиноевой кислоты, поэтому изменение экспрессии генов ферментов ее метаболизма и рецепторов может существенно нарушить развитие тканей, включающих дериваты клеток нервного гребня [127, 128]. Гены-кандидаты из этой системы обнаружены в исследованиях доместикации собаки [40, 74]. К сожалению, нам не удалось установить, насколько совпадают эти гены в двух указанных статьях, так как перечисление самих генов в статье Wang et al. [40] отсутствует. Полногеномный анализ доместичируемых лисиц [111] выявил четыре гена из системы ретиноевой кислоты, локализованных в регионах, предполагаемо подвергнутых отбору: *RBP5*, *RARB*, *ALDH1A3* и *CYP26B1*. Обнаружено, что количество мРНК *CYP26B1* в гиппокампе ручных лисиц отличается от такового у агрессивных (неопубликованные данные). Это указывает, что система ретиноевой кислоты изменена, по крайней мере, во взрослом организме, что может затрагивать взрослый нейрогенез, стресс, обучение и память, а также социальное поведение. Возможно, экспери-

ментальная domestикация лисиц затронула эту систему и в эмбриональный период развития, что требует дальнейших исследований.

Следует также отметить, что ретиноевая кислота, по-видимому, необходима для пролиферации и дифференцировки не только клеток предшественников нейронов, но и клеток предшественников олигодендроцитов [129], что связано с дальнейшей миелинизацией аксонов, а значит и с уже упомянутым в нескольких исследованиях геном-кандидатом *MBP* [98, 101, 102], который, однако, был исключен из списка Pendleton et al. [68] после последней стадии фильтрации результатов, учитывающей данные древней ДНК.

Перечисленные результаты не только поддерживают гипотезу “нервного гребня”, но позволяют предположить, что при отборе на эти гены главной мишенью была не их экспрессия в клетках нервного гребня, а роль в других структурах и процессах, например в образовании нервной трубки [128] и поведении [130]. Таким образом, гены-кандидаты, экспрессирующиеся в клетках нервного гребня и также имеющие широкий плейотропный эффект, могут оказывать прямое влияние на функционирование центральной нервной системы и на поведение, а через изменение миграции клеток нервного гребня — на возникновение скоррелированных последствий domestикации, включенных в ДС. Вместе эти эффекты и формируют взрослого domestичированного животного, включая поведенческие и морфофизиологические особенности. Это еще раз указывает, что механизмы domestикации невозможно выявить без исследования разных стадий развития как на молекулярном, так и на организменном уровне.

Таким образом, эксперимент по domestикации лисиц во многом воспроизводит ранние этапы domestикации собаки. Особенно четко параллели между этими процессами прослеживаются при изучении представителей “древних” пород и коренных беспородных собак, наиболее близких к их дикому предку. Анализ выборок, обогащенных такими собаками, поддерживает концепцию, что именно резкое изменение поведения, по-видимому, и являлось решающим шагом и движущей силой domestикации и позволило предку собаки освоить новую нишу, созданную человеком.

Авторы благодарят за помощь в подготовке рукописи сотрудников ИЦиГ СО РАН А.В. Владимирову, Л.В. Мейстер, Л.Н. Антимоний, Т.В. Пивоварову.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-14-50414.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных. Настоящая статья не содержит каких-

либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Darwin C. On the Origin of Species by Means of Natural Selection. London: J. Murray, 1859. 534 p.
2. Darwin C. Variation of Plants and Animals under Domestification. London: J. Murray, 1868.
3. Belyaev D.K. Destabilizing selection as a factor in domestification // J. Hered. 1979. V. 70. № 5. P. 301–308.
4. Galibert F., Quignon P., Hitte C. et al. Toward understanding dog evolutionary and domestification history // Comptes Rendus Biologies. 2011. V. 334. № 3. P. 190–196.
5. Кисловский Д.А. Проблема овладения процессом эволюции домашних животных // Избр. сочинения. М., Колос. 1965. С. 121–160.
6. Olsen S.J. Origins of the Domestic Dog. The Fossil Record. Tucson. Arizona. USA: The Univ. Arizona Press, 1985.
7. Clutton-Brock J. Origins of the dog: the archaeological evidence // The Domestic Dog: Its Evolution, Behavior and Interactions with People. Second ed. Cambridge: Cambr. Univ. Press, 2017. P. 7–22.
8. Morey D.F. The early evolution of the Domestic Dog // American Science. 1994. V. 82. P. 336–347.
9. Germonpré M., Sablin M.V., Lázničková-Galetová M. et al. Palaeolithic dogs and Pleistocene wolves revisited: a reply to Morey (2014) // J. Archaeol. Sci. 2015. V. 54. P. 210–216.
10. Старков И.Д. Разведение серебристо-черных лисиц. М.; Киев; Л.: КОИЗ, 1940. 96 с.
11. Forester J.E., Forester A.D. Silver fox odyssey // History of the Canadian Silver Fox Industry. Irwin Printing, Charlottedown, PEI, 1973. 134 p.
12. Милованов Л.В. Первые годы советского звероводства // Кролиководство и звероводство. 2003. № 6. С. 18–20.
13. Трут Л.Н. Генетика и фенотипика domestикационного поведения // Вопросы общей генетики / Под ред. Алтухова Ю.П. М.: Наука, 1981. С. 323–332.
14. Крушинский Л.В. Формирование поведения животных в норме и патологии. М.: МГУ, 1960. 263 с.
15. Hansen Wheat C., Fitzpatrick J.L., Rogell B. et al. Behavioural correlations of the domestification syndrome are decoupled in modern dog breeds // Nat. Commun. 2019. V. 10. № 1. P. 2422.
16. Жуков Д.А. Стой, кто ведет? Биология поведения человека и других зверей. М.: Альпина нон-фикшн, 2014. Т. 2. 374 с.
17. Ortolani A., Vernooij H., Coppinger R. Ethiopian village dogs: Behavioural responses to a stranger's approach // Appl. Anim. Behav. Sci. 2009. V. 119. № 3. P. 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2009.03.011>
18. Trut L.N. Early canid domestification: The farm-fox experiment: Foxes bred for tamability in a 40-year exper-

- iment exhibit remarkable transformations that suggest an interplay between behavioral genetics and development // *Am. Sci.* 1999. V. 87. № 2. P. 160–169.
19. *Trut L., Oskina I., Kharlamova A.* Animal evolution during domestication: the domesticated fox as a model // *BioEssays*. 2009. V. 31. № 3. P. 349–360.
 20. *Трут Л.Н., Плюснина И.З., Оськина И.Н.* Эксперимент по доместикиции лисиц и дискуссионные вопросы эволюции собак // *Генетика*. 2004. Т. 40. № 6. С. 794–807.
 21. *Lord K.A., Larson G., Coppinger R.P. et al.* The history of farm foxes undermines the animal domestication syndrome // *Trends Ecol. Evol.* 2020. V. 35. № 2. P. 125–136.
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.10.011>
 22. *Милованов Л.В.* История звероводства: “Салтыковский”. М.: Колос-Пресс, 2001.
 23. *Trut L., Kharlamova A., Herbeck Yu.* Belyaev’s and PEI’s Foxes: A Far Cry // *Trends Ecol. Evol.* 2020. V. 35. № 8. P. 649–651.
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2020.03.010>
 24. *Waddington C.H.* Genetic assimilation of an acquired character // *Evolution*. 1953. P. 118–126.
 25. *Serpell J., Duffy D.L., Jagoe J.A.* Becoming a dog: Early experience and the development of behavior // *The Domestic Dog: Its Evolution, Behavior and Interactions with People*. Second ed. Cambridge: Cambr. Univ. Press, 2017. Ch. 6. P. 99–117.
 26. *Bradshaw J., Rooney N.* Dog social behavior and communication // *The Domestic Dog: Its Evolution, Behavior and Interactions with People*. Second ed. Cambridge: Cambr. Univ. Press, 2017. Ch. 8. P. 133–159.
 27. *Darwin C.* The Expression of the Emotions in Man and Animals. N.Y.: Greenwood Press, 1873. 399 p.
 28. *Трут Л.Н.* Роль поведения в доместикиционных преобразованиях животных (на примере серебристо-черных лисиц): Дис. ... д-ра биол. наук. Новосибирск: ИЦиГ СО АН СССР, 1980. 410 с.
 29. *Gogoleva S.S., Volodin J.A., Volodina E.V. et al.* To bark or not to bark: Vocalizations by red foxes selected for tameness or aggressiveness toward humans // *Bioacoustics*. 2008. V. 18. № 2. P. 99–132.
 30. *Boyko A.R., Boyko R.H., Boyko C.M. et al.* Complex population structure in African village dogs and its implications for inferring dog domestication history // *PNAS*. 2009. V. 106. № 33. P. 13903–13908.
 31. *Liu Y.-H., Wang L., Xu T. et al.* Whole-genome sequencing of African dogs provides insights into adaptations against tropical parasites // *Mol. Biol. Evol.* 2018. V. 35. № 2. P. 287–298.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msx258>
 32. *Boitani L., Ciucci P., Ortolani A.* Behaviour and social ecology of free-ranging dogs // *The Behavioural Biology of Dogs*. Oxfordshire; Cambridge: CABI, 2007. P. 147–165.
 33. *Поярко А.Д.* Исторический (биографический) метод описания социальной организации и поведения бродячих собак (*Canis familiaris* L.) // Методы исследования в экологии и этологии: мат-лы докл. школы молодых биологов. Пушино, 1986. С. 179–199.
 34. *Поярко А.Д., Верецагин А.О., Богомолов П.Л.* Исследование популяции бездомных собак (*Canis familiaris*) на территории Москвы. Сообщ. 2 // *Зоол. журн.* 2011. Т. 90. № 6. С. 724–732.
 35. *Scott J.P., Fuller J.L.* Genetics and the Social Behavior of the Dog. Chicago: Univ. Chicago Press, 2012. 503 p.
 36. *von Holdt B.M., Driscoll C.A.* Origins of the dog: Genetic insights into dog domestication // *The Domestic Dog: Its Evolution, Behavior and Interactions with People* / Ed. Serpell J. Second ed. Cambridge: Cambr. Univ. Press, 2017. P. 22–41.
<https://doi.org/10.1017/9781139161800.003>
 37. *Keeler C.E.* Coat colour gene synthesis of tame behaviour in the rat, mink and fox // *Mind Over Matter*. 1964. 9. P. 16–30.
 38. *Croft R.B.* The culture of black and silver foxes // *Rod and gun in Canada*. 1912. 8. (Цит. по: 39).
 39. *Генерозов В.Я.* Промышленное разведение серебристо-черных лисиц и песцов в Северной Америке: Отчет по осмотру лисоводных питомников в Канаде. Петроград: Типография М. Меркушева, 1916. 256 с.
 40. *Wang G.-D., Zhai W., Yang H.-C. et al.* Out of southern East Asia: the natural history of domestic dogs across the world // *Cell Res.* 2016. V. 26. № 1. P. 21–33.
<https://doi.org/10.1038/cr.2015.147>
 41. *Bergström A., Frantz L., Schmidt R. et al.* Origins and genetic legacy of prehistoric dogs // *Science*. 2020. V. 370. № 6516. P. 557–564.
<https://doi.org/10.1126/science.aba9572>
 42. *Fan Z., Silva P., Gronau I. et al.* Worldwide patterns of genomic variation and admixture in gray wolves // *Genome Res.* 2016. V. 26. № 2. P. 163–173.
<https://doi.org/10.1101/gr.197517.115>
 43. *Statham M.J., Trut L.N., Sacks B.N. et al.* On the origin of a domesticated species: Identifying the parent population of Russian silver foxes (*Vulpes vulpes*) // *Biol. J. Linnean Soc.* 2011. V. 103. № 1. P. 168–175.
 44. *Беляев Д.К., Трут Л.Н.* Генетические взаимоотношения специфических изменений стандартной окраски серебристо-черных лисиц (“подпалов” и “звездочки”), возникших в процессе доместикиции // *Генетика*. 1986. Т. 22. № 1. С. 119–128.
 45. *Herre W., Röhrs M.* Haustiere-Zoologisch gesehen (Compendium of basic data). 1973.
 46. *Wayne R.K.* Cranial morphology of domestic and wild canids: The influence of development on morphological change // *Evolution*. 1986. V. 40. № 2. P. 243–261.
<https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1986.tb00467.x>
 47. *Clutton-Brock J.* Animals as Domesticates: A World View through History. Michigan: MSU Press, 2012. 200 p.
 48. *Benecke N.* Studies on early dog remains from Northern Europe // *J. Archaeol. Sci.* 1987. V. 14. № 1. P. 31–49.
[https://doi.org/10.1016/S0305-4403\(87\)80004-3](https://doi.org/10.1016/S0305-4403(87)80004-3)
 49. *Boudadi-Maligne M., Mallye J.-B., Langlais M. et al.* Magdalenian dog remains from Le Morin rock-shelter (Gironde, France). Socio-economic implications of a zootechnical innovation // *PALEO. Revue d’archéol-*

- ogie préhistorique. 2012. № 23. P. 39–54.
<https://doi.org/10.4000/paleo.2465>
50. Clutton-Brock J. Near Eastern canids and the affinities of the Natufian dogs // *Z. Tierzüchtung Züchtungsbiologie*. 1962. Bd. 76. S. 326–333.
 51. Lawrence B., Reed C.A. The Dogs of Jarmo, Prehistoric Archeology along the Zagros Flanks. Chicago: Univ. Chicago Oriental Institute, 1983. P. 485–489.
 52. Morey D. Dogs: Domestication and the Development of a Social Bond. Cambridge: Cambr. Univ. Press, 2010. 380 p.
 53. Tchernov E., Valla F.F. Two new dogs, and other Natufian dogs, from the southern Levant // *J. Archaeol. Sci.* 1997. V. 24. № 1. P. 65–95.
 54. Benecke N. Archäozoologische Studien zur Entwicklung der Haustierhaltung in Mitteleuropa und Südsandinavien von den Anfängen bis zum ausgehenden Mittelalter (Schriften zur Ur- und Frühgeschichte, Band 46). Berlin: De Gruyter Akademie Forschung, 1994. 451 s.
 55. Ameen C., Hulme-Beaman A., Avin A. et al. A landmark-based approach for assessing the reliability of mandibular tooth crowding as a marker of dog domestication // *J. Archaeol. Sci.* 2017. V. 85. P. 41–50.
 56. Waller B.M., Peirce K., Caeiro C.C. et al. Paedomorphic facial expressions give dogs a selective advantage // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 12. P. e82686.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082686>
 57. Janssens L., Perri A., Crombé P. et al. An evaluation of classical morphologic and morphometric parameters reported to distinguish wolves and dogs // *J. Archaeol. Sci. Rep.* 2019. V. 23. P. 501–533.
<https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2018.10.012>
 58. Трут Л.Н., Держинский Ф.Я., Никольский В.С. Компонентный анализ краниологических признаков серебристо-черных лисиц (*Vulpes fulvus* Desm.) и их изменений, возникающих при доместикации // *Генетика*. 1991. Т. 27. № 8. С. 1440–1449.
 59. Wood E.K., Maddux S.D., Southard T.E. et al. The effect of behavioral selection on the dentition of russian silver foxes and its implications for human dental evolution // *FASEB J.* 2019. V. 33. № S1. P. 452–519.
 60. Sánchez-Villagra M.R., Geiger M., Schneider R.A. The taming of the neural crest: a developmental perspective on the origins of morphological covariation in domesticated mammals // *R. Soc. Open Sci.* 2016. V. 3. № 6.
<https://doi.org/10.1098/rsos.160107>
 61. Wilkins A.S., Wrangham R.W., Fitch W.T. The “domestication syndrome” in mammals: A unified explanation based on neural crest cell behavior and genetics // *Genetics*. 2014. V. 197. № 3. P. 795–808.
<https://doi.org/10.1534/genetics.114.165423>
 62. Hansen Wheat C., Bijl W. van der, Wheat C.W. Morphology does not covary with predicted behavioral correlations of the domestication syndrome in dogs // *Evol. Lett.* 2020. V. 4. № 3. P. 189–199.
<https://doi.org/10.1002/evl3.168>
 63. Lindblad-Toh K., Wade C.M., Mikkelsen T.S. et al. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog // *Nature*. 2005. V. 438. № 7069. P. 803–819.
<https://doi.org/10.1038/nature04338>
 64. Larson G., Karlsson E.K., Perri A. et al. Rethinking dog domestication by integrating genetics, archeology, and biogeography // *PNAS*. 2012. V. 109. № 23. P. 8878–8883.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1203005109>
 65. Ostrander E.A., Wang G.-D., Larson G. et al. Dog10K: An international sequencing effort to advance studies of canine domestication, phenotypes and health // *Natl Sci. Res.* 2019. V. 6. № 4. P. 810–824.
<https://doi.org/10.1093/nsr/nwz049>
 66. Pilot M., Moura A.E., Okhlopkov I.M. et al. Global phylogeographic and admixture patterns in grey wolves and genetic legacy of an ancient siberian lineage // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 1–13.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-53492-9>
 67. Botigüé L.R., Song S., Scheu A. et al. Ancient European dog genomes reveal continuity since the Early Neolithic // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 16082.
<https://doi.org/10.1038/ncomms16082>
 68. Pendleton A.L., Shen F., Taravella A.M. et al. Comparison of village dog and wolf genomes highlights the role of the neural crest in dog domestication // *BMC Biol.* 2018. V. 16. № 1. P. 64.
<https://doi.org/10.1186/s12915-018-0535-2>
 69. Adeola A.C., Ommeh S.C., Song J.-J. et al. A cryptic mitochondrial DNA link between North European and West African dogs // *J. Genet. Genom.* 2017. V. 44. № 3. P. 163–170.
<https://doi.org/10.1016/j.jgg.2016.10.008>
 70. Freedman A.H., Gronau I., Schweizer R.M. et al. Genome sequencing highlights the dynamic early history of dogs // *PLoS Genet.* 2014. V. 10. № 1. P. e1004016.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004016>
 71. Бибииков Д.И., Кудактин А.Н., Рябов А.С. Синантропные волки: распространение, экология // *Зоол. журн.* 1985. Т. 64. № 3. С. 429–440.
 72. Thalmann O., Perri A.R. Paleogenomic inferences of dog domestication // *Paleogenomics: Genome-Scale Analysis of Ancient DNA Population Genomics* / Ed. Lindqvist C., Rajora O.P. Cham: Springer Intern. Publ., 2019. P. 273–306.
 73. Frantz L.A.F., Bradley D.G., Larson G. et al. Animal domestication in the era of ancient genomics // *Nat. Rev. Genet.* 2020. V. 21. № 8. P. 449–460.
<https://doi.org/10.1038/s41576-020-0225-0>
 74. Morey D.F., Jeger R. Paleolithic dogs: Why sustained domestication then? // *J. Archaeol. Sci. Rep.* 2015. V. 3. Suppl. C. P. 420–428.
 75. Perri A. A wolf in dog’s clothing: Initial dog domestication and Pleistocene wolf variation // *J. Archaeol. Sci.* 2016. V. 68. P. 1–4.
 76. Drake A.G., Coquerelle M., Colombeau G. 3D morphometric analysis of fossil canid skulls contradicts the suggested domestication of dogs during the late Paleolithic // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. № 1. P. 1–8.
<https://doi.org/10.1038/srep08299>
 77. Germonpré M., Sablin M.V., Stevens R.E. et al. Fossil dogs and wolves from Palaeolithic sites in Belgium, the Ukraine and Russia: osteometry, ancient DNA and stable isotopes // *J. Archaeol. Sci.* 2009. V. 36.

- № 2. P. 473–490.
<https://doi.org/10.1016/j.jas.2008.09.033>
78. *Germonpré M., Lázníčková-Galetová M., Sablin M.V.* Palaeolithic dog skulls at the Gravettian Předmostí site, the Czech Republic // *J. Archaeol. Sci.* 2012. V. 39. № 1. P. 184–202.
<https://doi.org/10.1016/j.jas.2011.09.022>
 79. *Crockford S.J., Kuzmin Y.V.* Comments on Germonpré et al., *Journal of Archaeological Science* 36, 2009 “Fossil dogs and wolves from Palaeolithic sites in Belgium, the Ukraine and Russia: osteometry, ancient DNA and stable isotopes”, and Germonpré, Lázníčková-Galetová, and Sablin, *Journal of Archaeological Science* 39, 2012 “Palaeolithic dog skulls at the Gravettian Předmostí site, the Czech Republic” // *J. Archaeol. Sci.* 2012. V. 39. № 8. P. 2797–2801.
<https://doi.org/10.1016/j.jas.2012.04.033>
 80. *Ovodov N.D., Crockford S.J., Kuzmin Y.V. et al.* A 33000-year-old incipient dog from the Altai Mountains of Siberia: evidence of the earliest domestication disrupted by the Last Glacial Maximum // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 7. e22821.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022821>
 81. *Zeder M.A.* Pathways to animal domestication // *Biodiversity in Agriculture: Domestication, Evolution, and Sustainability*. Cambridge: Cambr. Univ. Press, 2012. P. 227–259.
 82. *Frantz L.A.F., Mullin V.E., Pionnier-Capitan M. et al.* Genomic and archaeological evidence suggest a dual origin of domestic dogs // *Science*. 2016. V. 352. № 6290. P. 1228–1231.
<https://doi.org/10.1126/science.aaf3161>
 83. *Liu L., Chen X.* The Archaeology of China: From the Late Paleolithic to the Early Bronze Age. Cambridge Univ. Press, 2012. 499 p. (цит. по: Zhang et al., 2020).
 84. *Zhang M., Sun G., Ren L. et al.* Ancient DNA evidence from China reveals the expansion of pacific dogs // *Mol. Biol. Evol.* 2020. V. 37. № 5. P. 1462–1469.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msz311>
 85. *Ollivier M., Tresset A., Frantz L.A.F. et al.* Dogs accompanied humans during the Neolithic expansion into Europe // *Biol. Lett.* 2018. V. 14. № 10. P. 1–4.
<https://doi.org/10.1098/rsbl.2018.0286>
 86. *Skoglund P., Ersmark E., Palkopoulou E. et al.* Ancient wolf genome reveals an early divergence of domestic dog ancestors and admixture into high-latitude breeds // *Cur. Biol.* 2015. V. 25. № 11. P. 1515–1519.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.04.019>
 87. *Sinding M.-H.S., Gopalakrishnan S., Ramos-Madrugal J. et al.* Arctic-adapted dogs emerged at the Pleistocene–Holocene transition // *Science*. 2020. V. 368. № 6498. P. 1495–1499.
<https://doi.org/10.1126/science.aaz8599>
 88. *Freedman A.H., Wayne R.K.* Deciphering the origin of dogs: From fossils to genomes // *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2017. V. 5. № 1. P. 281–307.
<https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-110937>
 89. *Pang J.-F., Kluetsch C., Zou X.-J. et al.* mtDNA Data indicate a single origin for dogs south of Yangtze River, less than 16,300 years ago, from numerous Wolves // *Mol. Biol. Evol.* 2009. V. 26. № 12. P. 2849–2864.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msp195>
 90. *Loog L., Thalmann O., Sinding M.-H.S. et al.* Ancient DNA suggests modern wolves trace their origin to a Late Pleistocene expansion from Beringia // *Mol. Ecol.* 2019.
<https://doi.org/10.1111/mec.15329>
 91. *Savolainen P., Zhang Y., Luo J. et al.* Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs // *Science*. 2002. V. 298. № 5598. P. 1610–1613.
<https://doi.org/10.1126/science.1073906>
 92. *Ding Z.-L., Oskarsson M., Ardalan A. et al.* Origins of domestic dog in Southern East Asia is supported by analysis of Y-chromosome DNA // *Heredity*. 2012. V. 108. № 5. P. 507–514.
<https://doi.org/10.1038/hdy.2011.114>
 93. *Thalmann O., Shapiro B., Cui P. et al.* Complete mitochondrial genomes of ancient canids suggest a European origin of domestic dogs // *Science*. 2013. V. 342. № 6160. P. 871–874.
<https://doi.org/10.1126/science.1243650>
 94. *vonHoldt B.M., Pollinger J.P., Lohmueller K.E. et al.* Genome-wide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication // *Nature*. 2010. V. 464. № 7290. P. 898–902.
<https://doi.org/10.1038/nature08837>
 95. *Shannon L.M., Boyko R.H., Castelhana M. et al.* Genetic structure in village dogs reveals a Central Asian domestication origin // *PNAS*. 2015. V. 112. № 44. P. 13639–13644.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1516215112>
 96. *Pilot M., Malewski T., Moura A.E. et al.* On the origin of mongrels: Evolutionary history of free-breeding dogs in Eurasia // *Proc. Royal Soc. B: Biol. Sci.* 2015. V. 282. № 1820. P. 20152189.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2015.2189>
 97. *Akey J.M., Ruhe A.L., Akey D.T. et al.* Tracking footprints of artificial selection in the dog genome // *PNAS*. 2010. V. 107. № 3. P. 1160–1165.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0909918107>
 98. *Axelsson E., Ratnakumar A., Arendt M.-L. et al.* The genomic signature of dog domestication reveals adaptation to a starch-rich diet // *Nature*. 2013. V. 495. № 7441. P. 360–364.
<https://doi.org/10.1038/nature11837>
 99. *Li Y., vonHoldt B.M., Reynolds A. et al.* Artificial selection on brain-expressed genes during the domestication of dog // *Mol. Biol. Evol.* 2013. V. 30. № 8. P. 1867–1876.
<https://doi.org/10.1093/molbev/mst088>
 100. *Wang G.-D., Zhai W., Yang H.-C. et al.* The genomics of selection in dogs and the parallel evolution between dogs and humans // *Nat. Commun.* 2013. V. 4. P. 1860.
<https://doi.org/10.1038/ncomms2814>
 101. *Cagan A., Blass T.* Identification of genomic variants putatively targeted by selection during dog domestication // *BMC Evol. Biol.* 2016. V. 16. № 1. P. 10.
<https://doi.org/10.1186/s12862-015-0579-7>
 102. *Freedman A.H., Lohmueller K.E., Wayne R.K.* Evolutionary history, selective sweeps, and deleterious variation in the dog // *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 2016. V. 47. № 1. P. 73–96.
<https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-121415-032155>

103. Zhang S., Wang G.-D., Ma P. et al. Genomic regions under selection in the feralization of the dingoes // Nat. Commun. 2020. V. 11. № 1. P. 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14515-6>
104. Cree B.A.C., Niu J., Hoi K.K. et al. Clemastine rescues myelination defects and promotes functional recovery in hypoxic brain injury // Brain. 2018. V. 141. № 1. P. 85–98. <https://doi.org/10.1093/brain/awx312>
105. Jantzie L.L., Corbett C.J., Berglass J. et al. Complex pattern of interaction between in utero hypoxia-ischemia and intra-amniotic inflammation disrupts brain development and motor function // J. Neuroinflammation. 2014. V. 11. № 1. P. 131. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-131>
106. Drobyshevsky A., Jiang R., Lin L. et al. Unmyelinated axon loss with postnatal hypertonia after fetal hypoxia // Ann. Neurol. 2014. V. 75. № 4. P. 533–541. <https://doi.org/10.1002/ana.24115>
107. Huang P., Chen X., Hu X. et al. Experimentally induced sepsis causes extensive hypomyelination in the prefrontal cortex and hippocampus in neonatal rats // Neuromol. Med. 2020. V. 22. № 3. P. 420–436. <https://doi.org/10.1007/s12017-020-08602-6>
108. Theofanopoulou C., Gastaldon S., O'Rourke T. et al. Self-domestication in *Homo sapiens*: Insights from comparative genomics // PLoS One. 2017. V. 12. № 10. P. e0185306. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185306>
109. Li Y., Wang G.-D., Wang M.-S. et al. Domestication of the dog from the wolf was promoted by enhanced excitatory synaptic plasticity: A hypothesis // Genome Biol. Evol. 2014. V. 6. № 11. P. 3115–3121. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu245>
110. O'Rourke T., Boeckx C. Glutamate receptors in domestication and modern human evolution // Neurosci., Biobehavioral Rev. 2020. V. 108. P. 341–357. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.10.004>
111. Kukekova A.V., Johnson J.L., Xiang X. et al. Red fox genome assembly identifies genomic regions associated with tame and aggressive behaviours // Nat. Ecol. Evol. 2018. V. 2. P. 1479–1491. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0611-6>
112. Wang X., Pipes L., Trut L.N. et al. Genomic responses to selection for tame/aggressive behaviors in the silver fox (*Vulpes vulpes*) // PNAS. 2018. V. 115. № 41. P. 10398–10403. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800889115>
113. Rodríguez-Moreno A., Sihra T.S. Metabotropic actions of kainate receptors in the CNS // J. Neurochem. 2007. V. 103. № 6. P. 2121–2135. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04924.x>
114. Turski G.N., Ikonomidou C. Glutamate as a neurotoxin // Handbook of Neurotoxicity / Ed. Kostrzewa R.M. N.Y.: Springer, 2014. P. 365–397. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5836-4_84
115. Hunter R.G., Bellani R., Bloss E. et al. Regulation of kainate receptor subunit mRNA by stress and corticosteroids in the rat hippocampus // PLoS One. 2009. V. 4. № 1. P. e4328. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004328>
116. Joëls M., Bosma A., Hendriksen H. et al. Corticosteroid actions on the expression of kainate receptor subunit mRNAs in rat hippocampus // Mol. Brain Res. 1996. V. 37. № 1. P. 15–20. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(95\)00267-V](https://doi.org/10.1016/0169-328X(95)00267-V)
117. Гербек Ю.Э., Гулевич П.Г., Шенелева Д.В. и др. Окситоцин: коэволюция человека и domesticiрованных животных // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2016. Т. 20. № 2. С. 220–227. <https://doi.org/10.18699/VJ16.145>
118. Kis A., Ciobica A., Topál J. The effect of oxytocin on human-directed social behaviour in dogs (*Canis familiaris*) // Horm. Behav. 2017. V. 94. P. 40–52. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2017.06.001>
119. Herbeck Y.E., Gulevich R.G. Neuropeptides as facilitators of domestication // Cell Tissue Res. 2019. V. 375. № 1. P. 295–307. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2939-2>
120. Wei L., Meaney M.J., Duman R.S. et al. Affiliative behavior requires juvenile, but not adult neurogenesis // J. Neurosci. 2011. V. 31. № 40. P. 14335–14345. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1333-11.2011>
121. Koch I.J., Clark M.M., Thompson M.J. et al. The concerted impact of domestication and transposon insertions on methylation patterns between dogs and grey wolves // Mol. Ecol. 2016. V. 25. № 8. P. 1838–1855. <https://doi.org/10.1111/mec.13480>
122. Barker G., Goucher C. The Cambridge World History Volume II: A world with agriculture, 12000 BCE–500 CE. Cambridge: Cambr. Univ. Press, 2015. 668 p.
123. Flannery K.V. Origins and ecological effects of early domestication in Iran and the Near East // The Domestication and Exploitation of Plants and Animals. London UK: Duckworth, 1969. P. 73–100.
124. Arendt M., Fall T., Lindblad-Toh K. et al. Amylase activity is associated with *AMY2B* copy numbers in dog: implications for dog domestication, diet and diabetes // Anim. Genet. 2014. V. 45. № 5. P. 716–722. <https://doi.org/10.1111/age.12179>
125. Arendt M., Cairns K.M., Ballard J.W.O. et al. Diet adaptation in dog reflects spread of prehistoric agriculture // Heredity. 2016. V. 117. № 5. P. 301–306. <https://doi.org/10.1038/hdy.2016.48>
126. Zeder M.A. Archaeological approaches to documenting animal domestication // Documenting Domestication: New Genetic and Archaeological Paradigms. Berkeley: Univ. California Press, 2006. P. 171–180.
127. Uehara M., Yashiro K., Mamiya S. et al. CYP26A1 and CYP26C1 cooperatively regulate anterior–posterior patterning of the developing brain and the production of migratory cranial neural crest cells in the mouse // Developmental Biol. 2007. V. 302. № 2. P. 399–411. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.09.045>
128. Maclean G., Dollé P., Petkovich M. Genetic disruption of CYP26B1 severely affects development of neural crest derived head structures, but does not compromise hindbrain patterning // Dev. Dynamics. 2009. V. 238. № 3. P. 732–745. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21878>
129. Morrison V.E., Smith V.N., Huang J.K. Retinoic acid is required for oligodendrocyte precursor cell production and differentiation in the postnatal mouse corpus callosum // Eneuro. 2020. V. 7. № 1. P. 1–18. <https://doi.org/10.1523/eneuro.0270-19.2019>
130. Zhang Y., Crofton E.J., Smith T.E. et al. Manipulation of retinoic acid signaling in the nucleus accumbens shell alters rat emotional behavior // Behav. Brain Res. 2019. V. 376. P. 112177. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112177>

Fox Domestication Experiment and Dog Evolution: A View from the Perspective of Modern Molecular, Genetic and Archaeological Data

L. N. Trut^{a, *}, A. V. Kharlamova^a, A. S. Pilipenko^a, and Yu. E. Herbeck^{a, **}

^aFederal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

**e-mail: trut@bionet.nsc.ru*

***e-mail: herbek@bionet.nsc.ru*

Domestication of plants and animals is one of the most significant cultural achievements that has influenced the evolutionary history of humans. The first domesticated animal is the dog. Despite the existence of numerous studies, the early stages of domestication remain poorly understood. In this review we highlight some parallels in behavioral changes and molecular genetic behavioral basis between domesticated foxes and dogs, with particular emphasis on ancient dog breeds. Three approaches to studying molecular-genetic mechanisms of domestication are described and some of its results, obtained by using modern methods, including next-generation sequencing, are given. The first approach is experimental modelling of early stages of domestication on the industrial farming animal – the fox. The second approach is a comparative analysis of modern dogs and wolves. The third approach includes paleogenetic analysis of ancient dogs and wolves, taking into account their archaeological context. Phylogenetic and phylogeographic approaches to the study of domestication of dogs and their role in the complex reconstruction of domestication mechanisms are discussed. Relevant complications related to time estimation, geographical localization and reconstruction of molecular mechanisms of dog domestication are considered in the context of sampling strategies for genomic analysis. The potential role of glutamate signaling pathway genes and neural crest cells having wide pleiotropic effect is discussed as they are the most important targets for selection in experimental and historical domestication. In conclusion, the relevance of studying domestication mechanisms, not only and perhaps not so much by studying adult animals as by analyzing different developmental stages at both molecular and organism levels, is once again highlighted.

Keywords: genetically tame foxes, ancient dog breeds, neurotransmitter pathway genes, behavior, domestication syndrome.

СООТНОШЕНИЕ ЛЕТАЛЬНЫХ И МУТАГЕННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ В ДНК ПЛАЗМИД И БАКТЕРИОФАГОВ, ИНДУЦИРОВАННЫХ 8-МЕТОКСИПСОРАЛЕНОМ + УФ ($\lambda \geq 320$ нм)

© 2021 г. В. Ю. Котова^{1,3,*}, С. К. Абишев², Г. Б. Завильгельский^{1,3,**}

¹Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов
Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”, Москва, 117545 Россия

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

³Научно-исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123098 Россия

*e-mail: v-kotova@mail.ru

**e-mail: zavilgel@mail.ru

Поступила в редакцию 03.12.2020 г.

После доработки 12.01.2021 г.

Принята к публикации 13.01.2021 г.

Проведено измерение K -соотношения количеств диаддуктов (D) и моноаддуктов (M), индуцированных 8-метоксипсораленом (8-МОП) в ДНК, упакованной в головке бактериофага λ и в ДНК плазмиды pBR322 при УФ-облучении ($\lambda \geq 320$ нм). Определены вероятности P UVR-эксцизионной репарации моноаддуктов 8-МОП, а также S и S_m SOS-репарации диаддуктов и моноаддуктов 8-МОП. Измерение P проводилось с использованием ангулярного производного ангелицина. Показано, что $P = 0.86$. Для определения S и S_m использовали бактериофаг λ_{11} , обработанный 8-МОП + УФ ($\lambda \geq 320$ нм) или 8-МОП + УФ ($\lambda \geq 380$ нм), и высеянный или на предварительно облученные коротковолновым УФ ($\lambda = 254$ нм) бактерии, или на бактерии с конститутивным синтезом генов SOS-регулона, а также на бактерии, содержащие плазмиду pKM101. У бактериофага λ_{11} определяли степень W-реактивации (α) и частоту W-мутационного cleavage-мутаций (m). Показано, что диаддукты (“сшивки”) 8-МОП репарируются бактериальной SOS-системой с вероятностью $S = 0.28–0.29$, а моноаддукты 8-МОП репарируются бактериальной SOS-системой с вероятностью $S_m = 0.41$ лишь при участии фермента MucA₂B, гены которого расположены в конъюгативной плазмиде pKM101.

Ключевые слова: 8-метоксипсорален, ДНК, диаддукт, моноаддукт, плазида, бактериофаг, UVR-репарация, SOS-репарация, W-реактивация, W-мутационный синтез.

DOI: 10.31857/S0016675821070092

При фотосенсибилизации бактерий и бактериофагов при помощи 8-метоксипсоралена (8-МОП) плюс УФ ($\lambda \geq 320$ нм) в ДНК образуются два типа фотопродуктов: моноаддукты (молекула 8-МОП ковалентно связана с одним пиримидиновым основанием) и диаддукты, или межнитевые “сшивки” (молекула 8-МОП ковалентно связана с двумя пиримидиновыми основаниями из комплементарных нитей) [1–4].

Принципиальное значение при анализе действия 8-МОП на ДНК имеет величина K , характеризующая соотношение моноаддуктов и диаддуктов:

$$M = K \times D,$$

где M – число моноаддуктов, D – число диаддуктов.

Величина K зависит от ряда факторов. Во-первых, K зависит от длины волны УФ, используемого при освещении раствора с 8-МОП. Например при использовании УФ с длиной волны больше

380 нм в ДНК образуются практически исключительно моноаддукты 8-МОП, т.к. для вторичной реакции, сшивающей моноаддукт с комплементарной нитью, требуется значительно более короткая длина волны УФ (320–350 нм) [5]. Во-вторых, K зависит от состояния ДНК. Например, ДНК, упакованная внутри головки бактериофагов, характеризуется меньшей величиной K по сравнению со свободной ДНК [6].

Необходимо также учитывать возможности репарации моноаддуктов и диаддуктов в бактериальной клетке. Так как моноаддукты и диаддукты 8-МОП блокируют процесс репликации, проводимый ДНК-полимеразой III, то естественно считать, что при высеивании плазмид, обработанных 8-МОП, и фага на УФ-необлученных бактериях *E. coli* Δ uvr Δ recA в связи с отсутствием систем эксцизионной репарации (UVR) и пострепликативной репарации (RecA) каждый моноаддукт и

диаддукт в ДНК несут летальный характер. В *E. coli uvr+recA+* моноаддукты 8-МОП репарируются ферментами эксцизионной репарации UVR с такой же эффективностью P (P – вероятность эксцизионной репарации моноаддуктов и циклобутановых пиримидиновых димеров), как и циклобутановые димеры пиримидинов [7]. Но моноаддукты 8-МОП в ДНК фагов и плазмид не способны репарироваться пострепликативной рекомбинационной системой (RecA). Это связано с необходимостью наличия в клетке второй копии неповрежденного в этом локусе гомологичного генома, так как фаги и плазмиды инфицируют клетку, как правило, в одном экземпляре (в опыте используется низкая, много меньше единицы, множественность инфекции).

Диаддукты (“сшивки”) в ДНК фагов и плазмид при их высеве на УФ-необлученных штаммах *E. coli ΔuvrΔrecA* и *E. coli Δuvr* летальны на 100%, т.к. блокируют репликацию и не репарируются. Для репарации “сшивки” требуются выщепление “плеча” сшивки из одной из комплементарных нитей, проводимое ферментами эксцизионной репарации UVR, и последующее заполнение образуемой “бреши”. Диаддукты 8-МОП в ДНК фагов и плазмид при их высеве на необлученных бактериях *uvr+recA+*, т.е. при отсутствии в клетке активной системы SOS-репарации, также 100%-но летальны, т.к. несмотря на выщепление “плеча” сшивки ферментами UVR, заполнить “брешь” система пострепликативной RecA-рекомбинационной репарации не способна из-за отсутствия в клетке второй копии генома фага или плазмиды. В работе [8] это было экспериментально подтверждено: в ДНК фага λ , высеянного на необлученных бактериях *E. coli uvr+recA+*, формирование одного диаддукта в ДНК соответствует примерно одному летальному удару, в то время как моноаддукты 8-МОП с высокой эффективностью репарируются ферментами UVR.

При УФ-облучении в бактериях индуцируется SOS-система репарации ДНК, регуляция которой определяется двумя белками – репрессором LexA и белком RecA [9, 10]. В бактериях *E. coli* в составе SOS-регулона расположены гены *umuC* и *umuD* [11], кодирующие субъединицы полимеразы PolV (UmuD₂C), которая преодолевает блок репликации, вызванный летальным дефектом в ДНК, вставляя напротив поврежденного нуклеотида, как правило, некомплементарный нуклеотид [12–14]. В результате процесса, который получил наименование “translesion synthesis”, одновременно увеличивается выживаемость бактерий и индуцируются мутации [15]. Показано, что в этом процессе помимо полимеразы PolV важную роль играет активированный белок RecA* (звездочка обозначает активированное состояние белка) [16, 17]. Активация RecA происходит в результате образования связи RecA с односторонней ДНК, которая

образуется в значительном количестве в УФ-облученных бактериях в процессе репликации и ее блокирования летальными повреждениями. Белки системы SOS-репарации способны репарировать и вызывать мутации не только в хромосоме бактерии, но также в плаزمиде и ДНК бактериофагов, особенно эффективно у умеренных бактериофагов (например фаг λ), в меньшей степени – у условно летальных бактериофагов, например, фаги T1, T3, T7 [18], и не способна репарировать активно летальные фаги типа T2, T4, которые убивают клетку и ингибируют основные внутриклеточные процессы уже практически в момент адсорбции [19]. Феномен возрастания выживаемости и частоты мутаций у фагов и плазмид, высеянных на бактериях с предварительно индуцируемой SOS-системой, в честь первооткрывателя эффекта J. Weigle (1953 г.) носит название W-реактивации и W-мутационеза [9].

В настоящей работе проведено измерение K -соотношения количеств диаддуктов (D) и моноаддуктов (M) в ДНК, упакованной в головке бактериофага λ , и в ДНК плазмиды. Определены вероятности P эксцизионной репарации моноаддуктов и S и S_m (по [20]) SOS-репарации диаддуктов и моноаддуктов 8-МОП. Измерение P проводилось с использованием ангулярного производного ангелицина, который в силу структурных особенностей, способен образовывать лишь моноаддукты и не способен формировать диаддукты [20]. Для определения S и S_m использовали бактериофаг λ_{11} , обработанный 8-МОП + УФ ($\lambda \geq 320$ нм) или 8-МОП + УФ ($\lambda \geq 380$ нм), и высеянный или на предварительно облученные коротковолновым УФ ($\lambda = 254$ нм) бактерии, или на бактерии с конститутивным синтезом генов SOS-регулона, а также на бактерии, содержащие плазмиду pKM101.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы, бактериофаги и плазмиды

Бактериальные штаммы *Escherichia coli* K12: AB1157 F⁻ *thr-1 leu-6 proA2 his-4 thi-1 argE3 lacY1 galK2 ara14 xyl-5 mtl-1 tsx-33 rpsL31 supE44*; AB1886 *uvrA6*, AB2480 *uvrA6 recA13*, остальные маркеры – как у AB1157 (штаммы получены от проф. Р. Howland-Flanders, США), *Escherichia coli* DM1187 *recA441 lexA51 sfiA11 arg+*, остальные маркеры – как у AB1157 (штамм получен от проф. В.А. Ланцова, СПб государственный университет). Штаммы ТК603 *arg+ilvuvrA6*, остальные маркеры – как у AB1157; GW514 = ТК603 (pKM101 *mucAB+*) – получены от проф. G.C. Walker, США.

Бактериофаг λ_{11} ($\lambda v2v3$) получен от R. Devoret (Франция). Плазмиды pBR322.

Среды и условия роста бактерий

LB-среда: 1%-ный триптон, 0.5%-ный дрожжевой экстракт, 0.5%-ный NaCl; для верхнего и нижнего слоев чашек Петри использовали 0.7 и 1.8%-ный LB-агар. Бактерии растили в LB или LB плюс 100 мкг/мл ампициллина при постоянном перемешивании до средней экспоненциальной фазы при 30°C. Трансформацию бактериальных клеток, обработанных ионами Ca^{2+} , проводили согласно [21].

Буферы и реактивы

Трис-буфер: 0.05 М трис-HCl, 0.01 М NaCl, pH 7.5; ТМ-буфер: 0.05 М трис-HCl, 0.01 М NaCl, 0.001 М MgSO_4 , pH 7.8. 8-Метоксипсорален (8-МОП) – фирмы “Sigma”. Ангелицин получен от проф. G. Rodighiero (Италия).

Облучение бактерий, бактериофага и плазмид

Раствор ДНК в трис-буфере и суспензию фага в ТМ-буфере, содержащих 40 мкг/мл 8-МОП или 200 мкг/мл ангелицина, облучали при 4°C в пирексовых кюветах. Источником света $\lambda \geq 320$ нм служила ртутная лампа высокого давления СВД-120А с фильтром УФС-6. Лампу СВД-120А с фильтром ЖС-4 использовали в качестве источника света с $\lambda \geq 380$ нм. Расстояние лампы до образца – 20 см. Суспензию бактерий в ТМ-буфере облучали коротковолновым УФ (254 нм), источником которого служила ртутная лампа низкого давления БУВ-15. Дозу УФ-света измеряли дозиметром УФД-4 с магниевым фотоэлементом.

W-реактивация и W-мутация

Бактерии в экспоненциальной фазе дважды отмывали ТМ-буфером, концентрировали в пять раз в том же буфере и облучали при 20°C лампой БУВ-15 (254 нм) различными дозами. Адсорбцию фага λ на необлученных и УФ-облученных клетках проводили в течение 15 мин в ТМ-буфере при 37°C. Посев комплекса фаг-бактерия проводили двухслойным методом с добавлением индикаторной культуры АВ2480. Для учета cleag-мутантов использовали фаг λ_{11} , который способен формировать две одноступенчатые мутации – cleag и vir. Спонтанный фон cleag-мутаций для различных препаратов фага равнялся: $8 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-3}$. У фага, обработанного 8-МОП + УФ ($\lambda \geq 320$ нм), определяли частоту cleag-мутаций среди выживших. Степень W-мутации определяли как отношение частоты мутаций при высеве фага на УФ (254 нм)-облученных клетках к частоте мутаций при высеве фага на необлученных клетках. Множественность инфекции не превышала 0.01.

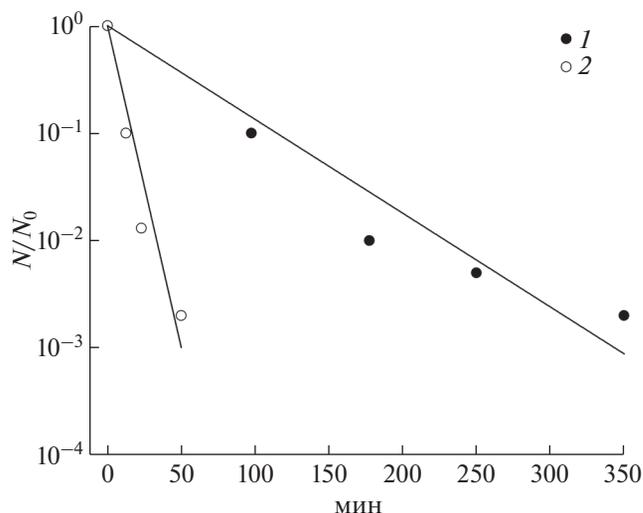


Рис. 1. Кинетические кривые инактивации плазмиды pBR322, обработанной ангелицином + УФ ($\lambda \geq 320$ нм) при трансформации штаммов *E. coli* K12. 1 – АВ1157 *uvr+recA+*, 2 – АВ2480 *uvrA6 recA13*. По оси абсцисс отложено время облучения плазмидной ДНК (мин), по оси ординат – степень выживаемости плазмиды N/N_0 .

Для измерения W-реактивации у плазмиды pBR322 клетки обрабатывали ионами Ca^{2+} , а затем облучали разными дозами УФ (254 нм). Степень W-реактивации (α) для фага и плазмиды определяли по формуле: $\alpha = N_{nn}N_{oo}/N_{on}N_{no}$, где N_{nn} – титр необлученных фага и плазмиды на необлученных бактериях, N_{oo} – титр облученных фага и плазмиды на облученных бактериях, N_{on} – титр облученных фага и плазмиды на необлученных бактериях, N_{no} – титр необлученных фага и плазмиды на облученных бактериях.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Высев фагов и плазмид на необлученных бактериях

В настоящей работе измерение P (вероятность эксцизионной репарации UVR) проводилось с использованием ангулярного производного ангелицина, который в силу структурных особенностей, способен образовывать лишь моноаддукты и не способен формировать диаддукты. Были получены кинетические кривые инактивации плазмиды pBR322, обработанной с помощью ангелицина + УФ ($\lambda \geq 320$ нм) при трансформации необлученных штаммов *E. coli* АВ1157 *uvr+recA+* и АВ2480 $\Delta uvr \Delta recA$ (рис. 1), которые описываются следующими формулами:

$N/N_0 = e^{-M}$ – для штамма АВ2480, т.к. каждый моноаддукт летален,

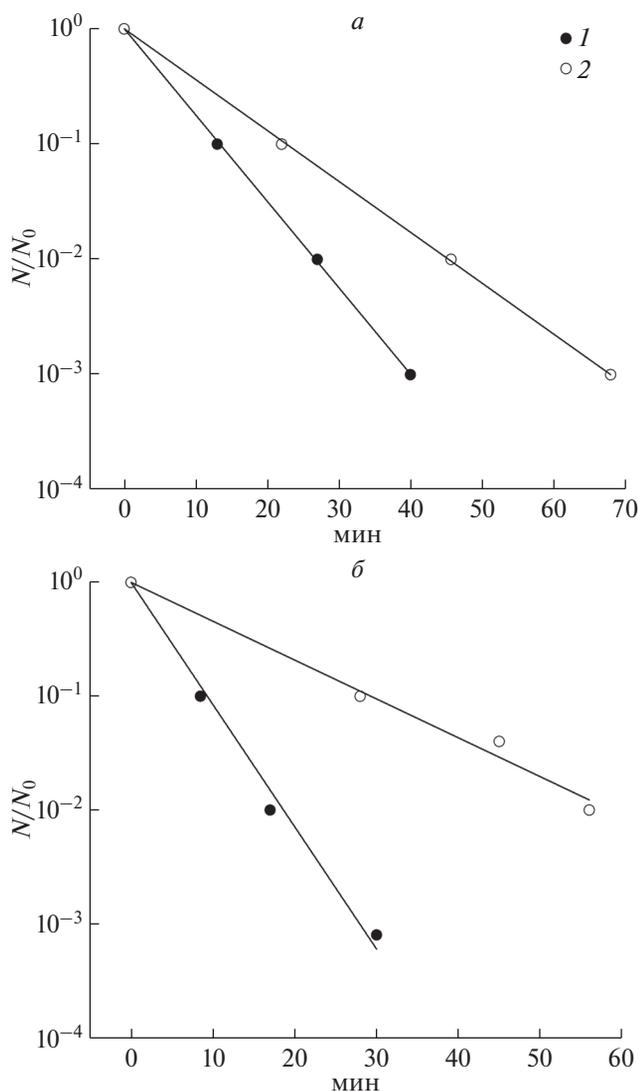


Рис. 2. Кинетические кривые инактивации обработанных 8-МОП + УФ ($\lambda \geq 320$ нм) бактериофага λ (а) и плазмиды pBR322 (б) при инфекции или трансформации штаммов *E. coli* K12: 1 – AB1157 *uvr+recA+*; 2 – AB2480 *uvrA6 recA13*. По оси ординат отложена выживаемость N/N_0 , по оси абсцисс время облучения препарата (мин).

$N/N_0 = e^{-(1-P)M}$ – для штамма AB1157, т.к. летален только каждый нерепарированный моноаддукт.

Из полученного соотношения наклонов кинетических кривых инактивации, $\sigma^{AB1157}/\sigma^{AB2480} = 0.14$, получаем: $M \times (1 - P)/M = (1 - P) = 0.14$, и вероятность эксцизионной репарации моноаддуктов $P = 0.86$.

Для измерения величины K ($M = KD$) были определены кинетические кривые 8-МОП + UV ($\lambda \geq 320$ нм) инактивации плазмиды pBR322 и бактериофага λ при высеве на необлученных бактериях AB2480 и AB1157 (рис. 2):

$N/N_0 = e^{-D(1+K)}$ – для штамма AB2480, т.к. каждые моноаддукт и диаддукт летальны;

$N/N_0 = e^{-D[1 + K(1 - P)]}$ – для штамма AB1157, т.к. каждый диаддукт летален, а моноаддукт летален с вероятностью $(1 - P)$. Из полученного соотношения наклонов, равных $\sigma^{AB2480}/\sigma^{AB1157} = 1.7$ для бактериофага, и $= 3.3$ для плазмиды и с учетом полученного ранее значения $P = 0.86$, определяем величины K : $\sigma^{AB2480}/\sigma^{AB1157} = (1 + K)/[1 + (1 - P)K]$. $K = 0.92$ – для бактериофага λ , т.е. на один диаддукт образуется в среднем один моноаддукт, и $K = 4.3$ для плазмидной ДНК, т.е. на один диаддукт образуется в среднем примерно 4.5 моноаддуктов.

Высев фагов и плазмид на УФ-облученные бактерии AB1157 и AB1886 и на необлученные бактерии штамма DM1187

Вначале нами были определены оптимальные дозы УФ (254 нм)-облучения для бактерий AB1157 и AB1886 *uvrA6*, при которых в клетках максимальной индуцируется система SOS-репарации. На рис. 3 и 4 представлены данные по возрастанию выживаемости фага λ_{11} (далее обозначен λ) (рис. 3) и плазмиды pBR322 (рис. 4), облученных или коротковолновым УФ (254 нм), индуцирующим в качестве основных, блокирующих репликацию, летальных дефектов ДНК циклобутановые пиримидиновые димеры, или УФ-светом с $\lambda \geq 320$ нм в присутствии 8-МОП. У бактериофага λ_{11} определяли одновременно частоту “clear” мутаций. Доза УФ для облучения препаратов фага и плазмиды выбиралась таким образом, чтобы уровень инактивации объектов при высеве на необлученных бактериях равнялся примерно 10^{-3} . Бактерии AB1157 и AB1886 *uvrA6* облучали разными дозами коротковолнового УФ (254 нм). Степень W-реактивации α для фагов и плазмид определяется по формуле: $\alpha = N_{nn}N_{oo}/N_{on}N_{no}$ (см. Материалы и методы).

Как видно из рис. 3 и 4, выживаемость фага и плазмид увеличивается, одновременно у фага λ_{11} растет частота “clear” мутаций в связи с активностью системы SOS-репарации в предварительно УФ (254 нм)-облученных разными дозами бактериях. В случае УФ (254 нм)-облученного фага (рис. 3,а) и плазмиды (рис. 4), содержащих в ДНК циклобутановые димеры пиримидинов, максимальные значения α и частоты мутаций m достигаются при УФ-дозе на бактерии около 30 Дж/м² для штамма AB1157, и около 6 Дж/м² для штамма AB1886 *uvrA6*. Аналогичный результат был получен и для 8-МОП + УФ ($\lambda \geq 320$ нм) – инактивированных фага λ_{11} и плазмиды, однако только при использовании в качестве хозяина бактерий AB1157, т.к. при использовании бактерий AB1886 *uvrA6* SOS-репарация и индукция “clear” мутаций

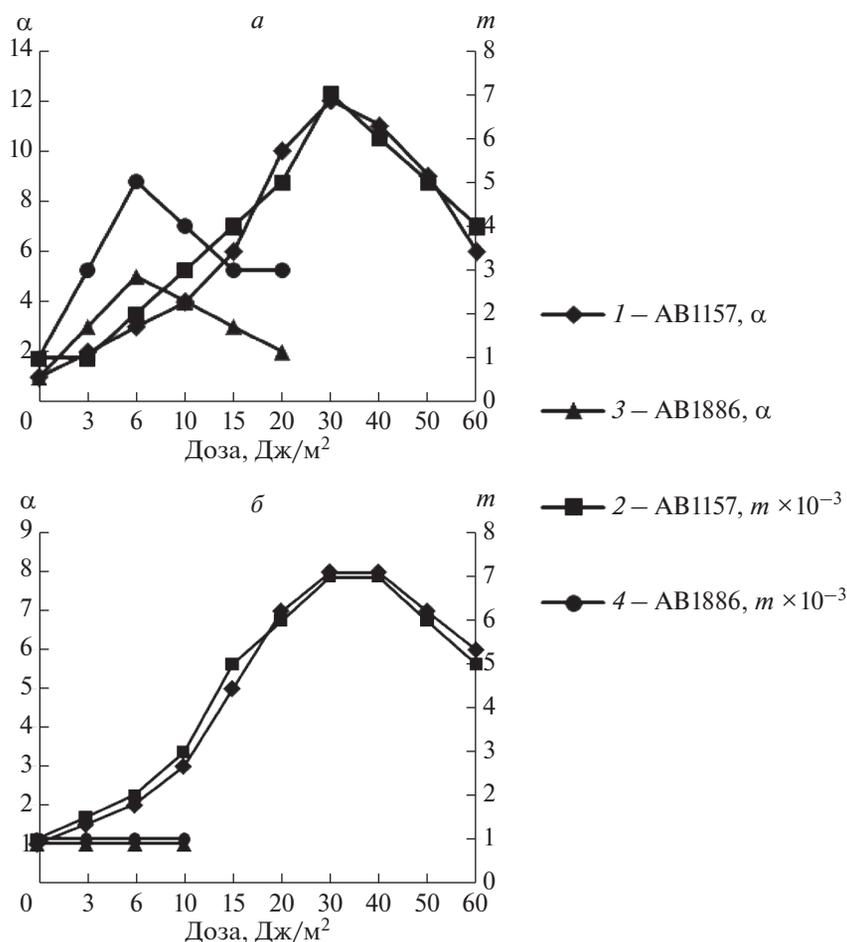


Рис. 3. W-реактивация и W-мутagenез бактериофага λ_{11} , облученного УФ (254 нм) (а) и обработанного 8-МОП + УФ ($\lambda \geq 320$ нм) (б) при инфекции штаммов *E. coli* K12 AB1157 *uvr+recA+* (1, 2) и AB1886 *uvrA6* (3, 4). Бактерии облучались разными дозами УФ (254 нм). 1 и 3 – кривые W-реактивации, 2 и 4 – кривые W-мутagenеза. По оси абсцисс отложены дозы УФ (254 нм) на бактерии, в Дж/м². По осям ординат отложены α -степень W-реактивации и m – частота cleag-мутаций среди выживших. Доза УФ (254 нм) на фаг при высева на AB1157 равнялась 140 Дж/м², выживаемость фага на необлученных бактериях AB1157 равнялась 1.2×10^{-3} . Доза УФ (254 нм) на фаг при высева на AB1886 равнялась 20 Дж/м², выживаемость фага на необлученных бактериях AB1886 равнялась 1.1×10^{-3} . Время облучения фага с 8-МОП + УФ ($\lambda \geq 320$ нм) при высева на AB1157 равно 55 мин, выживаемость фага на необлученной культуре равно 1.7×10^{-3} , а на AB1886 – 45 мин, выживаемость фага на необлученных бактериях AB1886 равна 1.4×10^{-3} . Частота cleag-мутаций фага на необлученных бактериях AB1886 и AB1157 равна 1.0×10^{-3} .

у фага λ_{11} и SOS-репарация у плазмиды не наблюдались (рис. 3, б и рис. 4).

При высева 8-МОП + УФ ($\lambda \geq 320$ нм)-обработанных разными дозами фагов и плазмид на предварительно УФ (254 нм)-облученных бактериях необходимо учитывать SOS-репарацию моноаддуктов и диаддуктов в ДНК. В этой серии опытов мы использовали лишь штамм AB1157 и не использовали мутантный штамм AB1886 *uvrA6*, так как диаддукты 8-МОП не репарируются в связи с отсутствием UVR-ферментов, выщепляющих “плечо” сшивки, а моноаддукты 8-МОП (но не моноаддукты ангелицина) не репарируются SOS-системой бактерии, т.к. фермент PolV не способен

преодолевать блок репликации, вызываемый интеркалированной в ДНК молекулой 8-МОП [22].

На рис. 5, а представлены кинетические кривые 8-МОП + УФ ($\lambda \geq 320$ нм)-инактивации фага λ при высева на необлученных и УФ (254 нм)-облученных оптимальной дозой (30 Дж/м²) бактериях AB1157. Зависимости N/N_0 от количества диаддуктов D , образующихся в ДНК, выглядят следующим образом:

$$N/N_0 = e^{-D[1 + K(1-P)]}$$
 – бактерии необлучены (каждый диаддукт летален, и летальны не репарированные UVR-ферментами моноаддукты (см. формулы выше)).

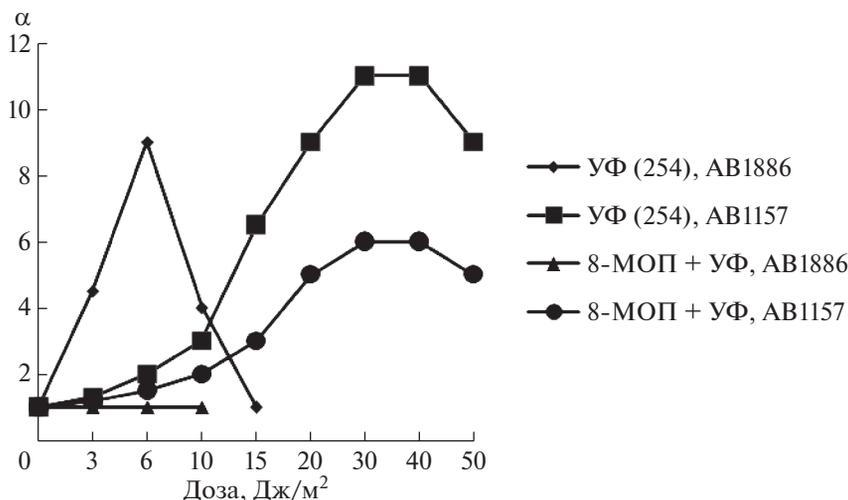


Рис. 4. W-реактивация плазмиды pBR322, облученной УФ (254 нм) и обработанной 8-МОП + УФ ($\lambda \geq 320$ нм) при инфекции штаммов *E. coli* K12 АВ1157 *uvr+recA+* и АВ1886 *uvrA6*. Дозы УФ (254 нм) облучения плазмиды равны 50 Дж/м² (АВ1886) и 210 Дж/м² (АВ1157), выживаемости на необлученных клетках равны соответственно 1.5×10^{-3} и 1.3×10^{-3} . Периоды времени облучения плазмиды УФ ($\lambda \geq 320$ нм) + МОП равны: 50 мин (АВ1886 *uvrA6*) и 90 мин (АВ1157), показатели выживаемости плазмиды на необлученных бактериях равны: 1.2×10^{-3} (АВ1886) и 1.4×10^{-3} (АВ1157). Бактерии облучали разными дозами УФ (254 нм). По оси абсцисс отложены дозы УФ (254 нм) на бактерии в Дж/м², по оси ординат — α -степень W-реактивации.

$N/N_0 = e^{-D[(1-S) + K(1-P)]}$ — бактерии УФ (254 нм) облучены оптимальной дозой 30 Дж/м². В этом варианте учтено, что диаддукты репарируются ферментами SOS-системы с вероятностью *S*, а моноаддукты репарируются ферментами эксцизионной репарации UVR с вероятностью *P*, но не репарируются ферментом PolV бактериальной системы SOS (согласно [22]).

Отношение наклонов кривых инактивации σ^-/σ^+ на необлученных и облученных бактериях равно 1.42 (рис. 5,а). Тогда:

$$D[(1-S) + K(1-P)]/D[1 + K(1-P)] = [(1-S) + K(1-P)]/[1 + K(1-P)] = 1/1.42, \text{ или:}$$

$$S = [1 + K(1-P)] \times (1 - 1/1.42) = (1 + 0.9 \times 0.14) \times (1 - 1/1.42) = 1.026 \times 0.42/1.42 = 0.29.$$

Следовательно, вероятность репарации диаддукта 8-МОП ферментами SOS-системы и одновременного формирования мутации в ДНК бактериофага λ равняется 0.29, и, соответственно, вероятность летального действия диаддукта 8-МОП на бактериофаг λ равна $1 - 0.29 = 0.71$.

В следующей серии опытов для высева фага λ был использован мутантный штамм *E. coli* DM1187 *recA441 sfiA11 lexA51arg⁺*, остальные маркеры как у АВ1157. В этом штамме осуществляется конститутивный синтез всех белков SOS-системы — мутация *lexA51* [23], а белок RecA (RecA441) активируется при повышенной температуре (42°C) при наличии в среде аденина (100 мкг/мл) [24]. Мутация *sfiA11* обеспечивает жизнеспособность штамма

при условии конститутивного синтеза SOS-регулона. Вначале была проведена проверка уровня индукции SOS-системы. Для этой цели клетки штаммов DM1187 и АВ1157 (контрольный штамм с закрытой SOS-системой) были трансформированы плазмидой pColD и определены сравнительные интенсивности люминесценции клеток. Штамм DM1187 характеризуется интенсивностью люминесценции, примерно в 100 раз превышающей таковую штамма АВ1157, что указывает на открытость системы SOS в штамме DM1187.

На рис. 5,б приведены кинетические кривые 8-МОП + УФ ($\lambda \geq 320$ нм)-инактивации фага λ при высева на штаммах АВ1157 и DM1187 без предварительного УФ (254 нм)-облучения. Чашки Петри с DM1187, содержащие в верхнем слое аденин (100 мкг/мл), инкубировали при 42°C. Зависимости N/N_0 от количества диаддуктов *D*, образующихся в ДНК, выглядят следующим образом:

$$N/N_0 = e^{-D[1 + K(1-P)]}$$
 — бактерии АВ1157 (каждый диаддукт летален, и летальны нерепарированные UVR-ферментами моноаддукты),

$$N/N_0 = e^{-D[(1-S) + K(1-P)]}$$
 — бактерии DM1187 (летальны нерепарированные UVR-ферментами моноаддукты и нерепарированные SOS-системой диаддукты).

Отношение наклонов кинетических кривых $\sigma^{AB1157}/\sigma^{DM1187} = 1.38$. Тогда: $S = 1.026 \times 0.38/1.38 = 0.28$. Следовательно, $S = 0.28$, что практически совпадает с результатом для предварительно УФ (254 нм)-облученных бактерий АВ1157 (рис. 5,а).

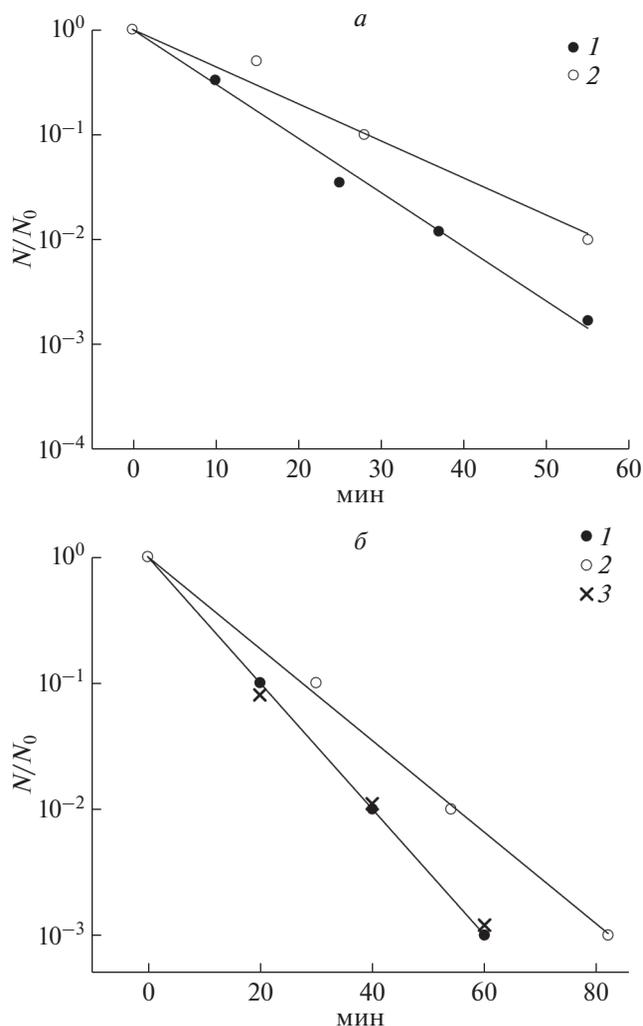


Рис. 5. Кинетические кривые инактивации обработанного 8-МОП + УФ ($\lambda \geq 320$ нм) бактериофага λ при высеве (а) на необлученных и УФ (254 нм)-облученных оптимальной дозой (30 Дж/м²) бактериях AB1157 *uvr+recA+* и (б) на необлученных бактериях AB1157 *uvr+recA+* (1) и необлученных бактериях DM1187 *recA441 lexA51 sfiA11 arg+*. Посев инфицированных фагом бактерий DM1187 на чашки Петри при 30°C (без аденина) (3) и при 42°C (+аденин) (2). По оси ординат отложена выживаемость N/N_0 , по оси абсцисс – время облучения препарата фага (мин).

Сравнение наклонов кинетических кривых 8-МОП + УФ ($\lambda \geq 320$ нм)-инактивации фага λ , полученных при высевах инфицированных фагом бактерий DM1187 на чашки Петри при 30°C (без аденина) и при 42°C (+аденин) позволяет оценить вклад активированного RecA* в процесс SOS-репарации диаддуктов 8-МОП. Как видно из рис. 5, б, отношение этих наклонов, равное σ^{30}/σ^{42} , практически равно отношению наклонов $\sigma^{AB1157}/\sigma^{42} = 1.38$. Следовательно можно считать, что активированный белок RecA* абсолютно необходим для SOS-репарации диаддуктов 8-МОП.

*W-реактивация моноаддуктов 8-МОП
с помощью полимеразы MucA₂B*

В следующей серии опытов для высева фага λ были использованы штаммы *E. coli* ТК603 *uvrA6* и

GW514 *uvrA6*, содержащий плазмиду pKM101 *mucAB+* [25, 26].

Препарат бактериофага был облучен УФ (254 нм) или обработан 8-МОП + УФ ($\lambda \geq 380$ нм), и содержал в ДНК, соответственно, циклобутановые пиримидиновые димеры или в основном моноаддукты 8-МОП [5]. На рис. 6 представлены кинетические кривые 8-МОП + УФ ($\lambda \geq 380$ нм)-инактивации (а) и УФ (254 нм)-инактивации (б) фага λ при высеве на необлученных и предварительно УФ (254 нм)-облученных оптимальной дозой (6 Дж/м²) бактериях GW514. Зависимости N/N_0 от количества моноаддуктов M , образующихся в ДНК фага (рис. 6, а), выглядят следующим образом:

$N/N_0 = e^{-M}$ – бактерии необлучены (каждый моноаддукт летален),

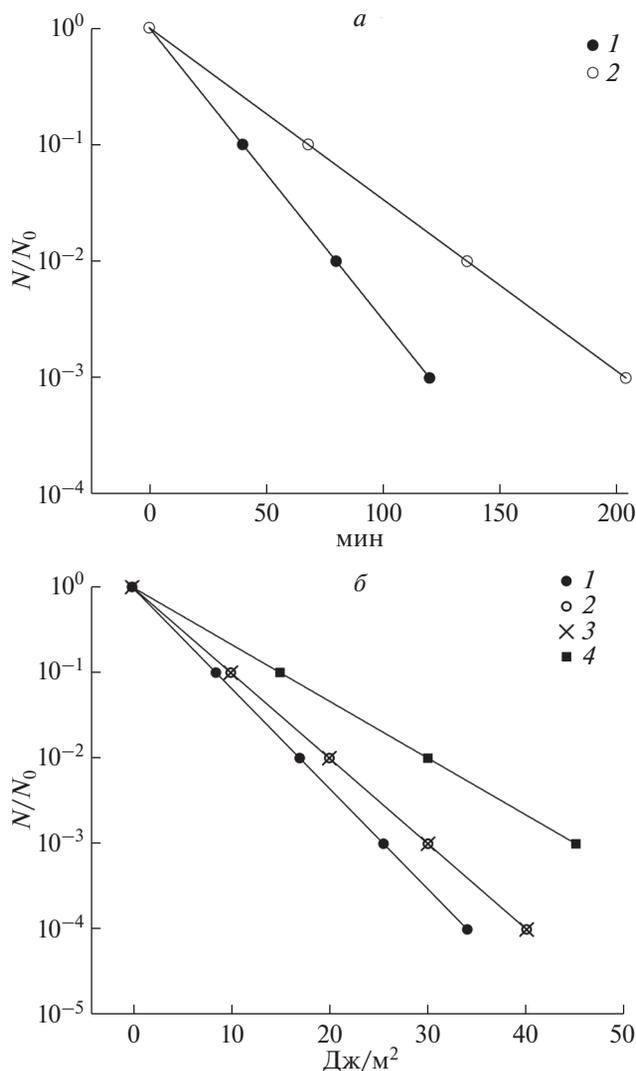


Рис. 6. Кинетические кривые инактивации обработанного 8-МОП + УФ ($\lambda \geq 380$ нм) (а) и облученного УФ (254 нм) (б) бактериофага λ при высеве на необлученных и УФ (254 нм)-облученных оптимальной дозой (6 Дж/м²) бактериях GW514 и ТК603 *uvrA6*. а: 1 – высев на необлученных бактериях GW514, 2 – высев на УФ (254 нм)-облученных дозой 6 Дж/м² бактериях GW514. б: 1 – высев на необлученных бактериях ТК603 *uvrA6*, 2 – высев на УФ (254 нм)-облученных дозой 6 Дж/м² бактериях ТК603 *uvrA6*, 3 – высев на необлученных бактериях GW514, 4 – высев на облученных дозой 6 Дж/м² бактериях GW514. По оси ординат отложена выживаемость N/N_0 , по оси абсцисс – время облучения препарата фага (мин) (а) и доза УФ (254 нм), Дж/м² (б).

$N/N_0 = e^{-M(1-S_m)}$ – бактерии УФ (254 нм)-облучены оптимальной дозой 6 Дж/м². В этом варианте учтено, что моноаддукты репарируются ферментом $MucA^2B$ с вероятностью S_m , но не репарируются ферментом PolV ($UmuD^2C$) бактериальной системы SOS (при высеве 8-МОП + УФ ($\lambda \geq 380$ нм)-облученного фага на штамме *E. coli* ТК603 *uvrA6* эффекты W-реактивации и W-мутагенеза отсутствуют). Кроме того, при наличии в ДНК бактериофага моноаддуктов 8-МОП при высеве на необлученных бактериях GW514 отсутствует феномен так называемой “Р-реактивации”, т.е. выживаемости фага на GW514 и ТК603 равны. От-

ношение наклонов кривых инактивации σ^-/σ^+ на необлученных и УФ (254 нм)-облученных бактериях GW514 равно 1.7 (рис. 6,а). Тогда: $(1 - S_m) = 1/1.7$, и, следовательно, вероятность SOS-репарации моноаддукта 8-МОП с участием полимеразы $MucA^2B$ $S_m = 1 - 1/1.7 = 0.41$, и, соответственно, вероятность летального действия моноаддукта равна $1 - 0.41 = 0.59$.

Несколько иначе выглядят кинетические кривые УФ (254 нм)-инактивации фага, ДНК которого содержит летальные циклобутановые пиримидиновые димеры (рис. 6,б). В этом случае имеет место феномен “Р-реактивации”: выживаемость УФ (254 нм)-облученного фага на необлученных УФ

(254) бактериях GW514, содержащих плазмиду рКМ101 *musAB*⁺, превышает выживаемость этого фага на необлученных бактериях ТК603 *uvrA6*. Следовательно полимеразы *MusA*'₂*B* способна преодолевать блок репликации, вызываемый циклобутановыми пиримидиновыми димерами (а также моноаддуктами ангелицина – данные не представлены), даже при условии отсутствия в клетке SOS-индукции, но не способна преодолевать блок репликации, вызываемый моноаддуктами 8-МОП без дополнительного участия ферментов бактериальной SOS-системы. Предварительное УФ (254 нм)-облучение бактерий GW514 лишь значительно усиливает W-реактивацию УФ (254 нм)-облученного фага, в частности, в связи с нарастанием экспрессии генов *musA* и *musB* [27]. Поэтому на рис. 6,б изображены четыре кинетические кривые инактивации УФ (254 нм)-облученного фага: на штамме GW514-необлученном и предварительно облученном дозой УФ (254 нм) 6 Дж/м², а также на ТК603 *uvrA6*-необлученном и предварительно облученном оптимальной дозой УФ (254 нм) 6 Дж/м².

ОБСУЖДЕНИЕ

На основании данных, представленных в настоящей работе, при определении относительных вкладов моноаддуктов и диаддуктов 8-МОП в качестве летальных и мутагенных дефектов в ДНК бактериофагов и плазмид, необходимо учитывать, во-первых, неспособность бактериальной SOS-системы, в состав которой входит полимеразы *PolV*, преодолевать блок репликации, вызываемый моноаддуктами 8-МОП, и, во-вторых, неспособность плазмидной полимеразы *MusA*'₂*B* преодолевать блок репликации, вызываемый моноаддуктами 8-МОП (отсутствие “P-реактивации”), без дополнительной помощи клеточной SOS-системы.

Необходимо отметить, что в работе [28], в которой впервые было показано, что именно диаддукты (“сшивки”) 8-МОП определяют формирование мутаций у бактериофага λ в процессе SOS-репарации, была допущена неточность относительно предполагаемой роли моноаддуктов 8-МОП в SOS-мутагенезе. В работе [28] было показано, что ангелицин, формирующий исключительно моноаддукты, с высокой эффективностью индуцирует SOS-мутагенез при высеве фага на предварительно УФ-облученных бактериях. На этом основании было высказано предположение, что и моноаддукты 8-МОП также должны индуцировать в бактериофагах SOS-мутагенез. Однако, как нами показано в настоящей работе, моноаддукты 8-МОП индуцируют SOS-мутагенез лишь при использовании плазмидной (рКМ101) полимера-

зы *MusA*'₂*B*, но не бактериальной полимеразы *PolV* (*UmuD*'₂*C*).

Представленные в настоящей работе данные о различной способности полимераз *MusA*'₂*B* и *UmuD*'₂*C* преодолевать блоки репликации, создаваемые “слабым интеркалятором” ангелицином или “сильным интеркалятором” моноаддуктом 8-МОП, представляют интересный, но не единственный пример влияния степени перекрытия ароматического кольца плоских интеркаляторов с азотистыми основаниями в ДНК на SOS-процесс формирования мутаций в бактериях. В частности показано, что карциноген N-2-ацетиламинофлуорен, плоская молекула которого встраивается внутрь двойной спирали ДНК, при SOS-репарации индуцирует в хромосоме бактерии формирование фрейм-шифт мутаций в последовательности 5'-GGCGCC, частота которых не зависит от полимеразы *UmuD*'₂*C*, но значительно возрастает при наличии полимеразы *MusA*'₂*B* [29].

Остается нерешенным вопрос об относительном вкладе моноаддуктов и диаддуктов в летальное и мутагенное действия 8-МОП + УФ ($\lambda \geq 320$ нм) на бактериальные клетки. Задача в данном случае усложнена в связи с наличием в бактериальной клетке второго генома и эффективным процессом пострепликативной рекомбинационной репарации, зависящей от значительной группы генов (*RecA*, *RecBC*, *RecE* и др.). В частности, можно предположить, что полимеразы *PolV* при участии белков системы рекомбинационной репарации, возможно, в той или иной степени способна преодолевать блок репликации, вызываемый моноаддуктами 8-МОП.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Dall'Acqua F., Marciani S., Rodighiero G.* Inter-strand cross-linkages occurring in the photoreactions between psoralen and DNA // *FEBS Lett.* 1970. V. 9. P. 121–123.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(70\)80330-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(70)80330-1)
2. *Cole R.S.* Psoralen monoadducts and interstrand cross-links in DNA // *Biochim. Biophys. Acta.* 1971. V. 254. P. 30–39.
[https://doi.org/10.1016/0005-2787\(71\)90111-0](https://doi.org/10.1016/0005-2787(71)90111-0)
3. *Dall'Acqua F., Marciani S., Ciavatta G., Rodighiero G.* Formation of interstrand cross-linkings in the photoreactions between fluorecoumarins and DNA // *Z. Naturforsch.* 1971. V. 26b. P. 561–565.
<https://doi.org/10.1515/znb-1971-0613>

4. *Rodighiero G., Dall'Acqua F.* Biochemical and medical aspect of psoralens // *Photochem. Photobiol.* 1976. V. 24. P. 647–653.
<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1976.tb06887.x>
5. *Chatterjee P.K., Cantor C.R.* Photochemical production of psoralen DNA monoadducts capable of subsequent photocross-linking // *Nucl. Acids Res.* 1978. V. 5. P. 3619–3633.
<https://doi.org/10.1093/nar/5.10.3619>
6. *Hradechna Z., Kittler L.* Photobiology of furocoumarins. Various types of cross-linking with DNA and their interference with the development of lambda phage // *Acta Virol.* 1982. V. 26. P. 305–311.
7. *Белогуров А.А., Зувев А.В., Завильгельский Г.Б.* Репарация моноаддуктов и диаддуктов 8-метоксипсоралена у бактериофагов и бактерий // *Мол. биология.* 1976. Т. 10(4). С. 857–867.
8. *Cassuto E., Gross N., Bardwell E., Howard-Flanders P.* Genetic effects of photoadducts and photocross-links in the DNA of phage λ exposed to 360 nm light and trimethyl-psoralen or khellin // *Biochim. Biophys. Acta.* 1977. V. 475. P. 589–600.
[https://doi.org/10.1016/0005-2787\(77\)90319-7](https://doi.org/10.1016/0005-2787(77)90319-7)
9. *Weigle J.J.* Induction of mutation in bacterial virus // *PNAS.* 1953. V. 39. P. 628–636.
<https://doi.org/10.1073/pnas.39.7.628>
10. *Radman M.* SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis // *Mol. Mech. for Repair of DNA* / Eds. Hanawalt P., Setlow R.B. N.Y.: Plenum Publ. Corp., 1975. Pt. A. P. 355–367.
https://doi.org/10.1007/978-1-4684-2895-7_48
11. *Kato T., Shinoura Y.* Isolation and characterization of mutants of *Escherichia coli* deficient in induction of mutations by ultraviolet light // *Mol. Gen. Genet.* 1977. V. 156. P. 121–131.
<https://doi.org/10.1007/BF00283484>
12. *Tang M., Bruck L., Eritja R., Tarner J. et al.* Biochemical basis of SOS-induced mutagenesis in *Escherichia coli*: Reconstitution of *in vitro* lesion bypass dependent on the UmuD[']₂C mutagenic complex and RecA protein // *PNAS.* 1998. V. 95. P. 9755–9760.
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.17.9755>
13. *Tang M., Shen X., Frank E.G., Woodgate R. et al.* UmuD[']₂C is an error-prone DNA polymerase // *PNAS.* 1999. V. 96. P. 8919–8924.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.8919>
14. *Reuven N.B., Arad G., Maor-Shoshani A., Livneh Z.* The mutagenesis protein UmuC is a DNA polymerase activated by UmuD['], RecA, and SSB, and is specialized for translesion replication // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 31763–31766.
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.45.31763>
15. *Defais M., Lesca C., Monsarrat B., Hanavalt P.* Translesion synthesis is the main component of SOS repair in bacteriophage lambda DNA // *J. Bacteriol.* 1989. V. 171. P. 4938–4944.
<https://doi.org/10.1128/jb.171.9.4938-4944.1989>
16. *Jiang Q., Karata K., Woodgate R., Cox M.M. et al.* The active form of DNA polymerase V is UmuD[']₂C-RecA*-ATP // *Nature.* 2009. V. 460. P. 359–363.
<https://doi.org/10.1038/nature08178>
17. *Patel M., Jiang Q., Woodgate R., Cox M.M. et al.* A new model for SOS-induced mutagenesis: How RecA protein activates DNA polymerase V // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2010. V. 45. P. 171–184.
<https://doi.org/10.3109/10409238.2010.480968>
18. *Завильгельский Г.Б., Белогуров А.А., Крюгер Д.Н.* W-реактивация и W-мутационез у бактериофагов λ и T7: сравнительный анализ действия ультрафиолетового излучения (254 нм) и фотосенсибилизаторов 8-метоксипсоралена и ангелицина // *Генетика.* 1982. Т. 18. № 1. С. 24–34.
19. *Krivisky A.S., Esipova V.V., Zuev A.V.* Induction of mutations and repair in bacteriophages after photosensitizing action of 8-methoxypsoralen // *Biologisches Zentralblatt.* 1979. V. 98. P. 175–183.
20. *Ashwood M.J., Grant F.* Conversion of psoralen DNA monoadducts in *Escherichia coli* to interstrand DNA cross-links by near UV light (320–360 nm): Inability of angelicin to form crosslinks *in vivo* // *Experientia.* 1977. V. 33. P. 384–386.
<https://doi.org/10.1007/BF02002841>
21. *Sambrook J., Fritsch E.P., Maniatis T.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Lab. Press., 1989. 1626 pp.
22. *Завильгельский Г.Б., Котова В.Ю.* SOS-репарация моноаддуктов 8-метоксипсоралена в ДНК бактериофага λ и плазмид осуществляется полимеразой MucA[']₂B, но не UmuD[']₂C (PolV) // *Генетика.* 2013. Т. 49. № 12. С. 1370–1375.
<https://doi.org/10.7868/S001667581312014X>
23. *Pacelli L., Edmiston S., Mount D.* Isolation and characterization of amber mutation in the *lexA* gene of *Escherichia coli* K12 // *J. Bacteriology.* 1979. V. 137. P. 568–573.
<https://doi.org/10.1128/JB.137.1.568-573.1979.573>
24. *George J., Buttin G.* Prophage induction and cell division in *Escherichia coli*. I. Further characterization of the thermosensitive mutation tif-1 whose expression mimics the effect of the UV-irradiation // *Mol. Gen. Genetics.* 1972. V. 119. P. 139–152.
<https://doi.org/10.1007/BF00269133>
25. *Dobson P.P., Walker G.C.* Plasmid pKM101 mediated W-reactivation in *Escherichia coli* K12 and *Salmonella typhimurium* LT: Genetic dependence, kinetics of induction and effect of chloramphenicol // *Mutation Res.* 1980. V. 71. P. 25–41.
[https://doi.org/10.1016/0027-5107\(80\)90004-4](https://doi.org/10.1016/0027-5107(80)90004-4)
26. *Hauser J., Levine A.S., Ennis D.G., Chumakov K.M. et al.* The enhanced mutagenic potential of the MucAB proteins correlates with the highly efficient processing of the MucA protein // *J. Bacteriol.* 1992. V. 174. P. 6844–6851.
<https://doi.org/10.1128/jb.174.21.6844-6851.1992>
27. *Elledge S.J., Walker G.C.* The *muc* genes of pKM101 are induced by DNA damage // *J. Bacteriol.* 1983. V. 155. P. 1306–1315.
<https://doi.org/10.1128/JB.155.3.1306-1315.1983>
28. *Belogurov A.A., Zavitelsky G.B.* Mutagenic effect of furocoumarin monoadducts and cross-links on bacteriophage lambda // *Mutation Res.* 1981. V. 84. P. 11–15.
[https://doi.org/10.1016/0027-5107\(81\)90045-2](https://doi.org/10.1016/0027-5107(81)90045-2)

29. Janel-Bintz R., Maenhaut-Michel G., Fuchs R.P. MucAB but not UmuDC proteins enhance (-2) frame shift mutagenesis induced by N-2-acetylaminofluo-

rene at alternating GC sequences // Mol. Gen. Genet. 1994. V. 245. P. 279–285.
<https://doi.org/10.1007/BF00290107>

The Ratio of Lethal and Mutagenic Damages in DNA of Plasmids and Bacteriophages after 8-Methoxypsoralen Plus Light ($\lambda \geq 320$ nm) Treatment

V. Yu. Kotova^{a, c, *}, S. K. Abilev^b, and G. B. Zavilgelsky^{a, c, **}

^aState Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of the National Research Center “Kurchatov Institute,” Moscow, 117545 Russia

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

^cNational Research Center “Kurchatov Institute,” Moscow, 123098 Russia

*e-mail: v-kotova@mail.ru

**e-mail: zavilgel@mail.ru

The K-ratio of diadducts (D) and monoadducts (M) of 8-methoxypsoralen (8-MOP) in the DNA, packed inside the head of the λ bacteriophage, and in the DNA of the pBR322 plasmid under UV irradiation ($\lambda \geq 320$ nm) was measured. The probabilities of P-UVR-excision repair of 8-MOP monoadducts and S and S_m – SOS repair of 8-MOP diadducts and monoadducts were determined. The measurement of P was performed using an angular derivative of angelicin. P is shown to have the value of 0.86. To determine S and S_m we used bacteriophage λ_{11} , treated with 8-MOP + UV ($\lambda \geq 320$ nm) or 8-MOP + UV ($\lambda \geq 380$ nm), and seeded either on pre-irradiated by short-wave UV ($\lambda = 254$ nm) bacteria, or on bacteria with constitutive synthesis of SOS-regulon genes, as well as on bacteria containing the pKM101 plasmid. The degree of W-reactivation (α) and the frequency of W-mutagenesis of clear mutations (m) were determined in bacteriophage λ_{11} . We show that diadducts (“crosslinks”) of 8-MOP are repaired by the bacterial SOS system with a probability of S = 0.28–0.29, and monoadducts of 8-MOP are repaired by the bacterial SOS system with a probability $S_m = 0.41$ only with the participation of the MucA₂B enzyme, whose genes are located in the pKM101 conjugative plasmid.

Keywords: 8-methoxypsoralen, DNA, diadduct, monoadduct, plasmid, bacteriophage, UVR-repair, SOS-repair, W-reactivation, W-mutagenesis.

УДК 575.857

ПОПУЛЯЦИОННАЯ СТРУКТУРА И ПРОИСХОЖДЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ФОРМ *Coregonus lavaretus pidschian* ИЗ р. ОЛЕНЁК

© 2021 г. Н. А. Бочкарев¹*, Д. С. Сендек², Е. И. Зуйкова¹, Л. П. Пестрякова³, Е. С. Захаров³, Н. Н. Захарова³, Л. П. Корякина⁴, Д. В. Политов⁵

¹Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630091 Россия

²Государственный научно-исследовательский институт озерного и речного рыбного хозяйства, Санкт-Петербург, 199053 Россия

³Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Амосова, Якутск, 677980 Россия

⁴Арктический государственный агротехнологический университет, Якутск, 677007 Россия

⁵Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: ih@eco.nsc.ru

Поступила в редакцию 18.08.2020 г.

После доработки 02.11.2020 г.

Принята к публикации 01.12.2020 г.

Представлены результаты морфогенетического анализа симпатрических форм/видов сига комплекса *Coregonus lavaretus pidschian* (*Coregonus pidschian*) бассейна р. Оленёк. Установлено, что в бассейне р. Оленёк обитают три дистантные формы сига, две из которых – *C. lavaretus pidschian* n. *brachymystax* и *C. lavaretus pidschian* n. *glacialis* – приурочены к приустьевому участку реки, а третья обнаружена в среднем течении реки. Показано, что все формы/виды имеют близкое число жаберных тычинок и прободенных чешуй в боковой линии, но различаются по размерам и внешнему облику. Анализ изменчивости гена *ND1* мтДНК показал, что эти сиги принадлежат к филогруппам, ранее выявленным в водоемах п-ва Таймыр. Новая форма сига из среднего течения р. Оленёк имеет такую же мтДНК, как и ледниково-равнинный сиг, а по данным аллозимного анализа он относится к группе восточносибирских сига, что свидетельствует о гибридной природе этой формы.

Ключевые слова: симпатрические сиги, экологическая форма, *C. lavaretus pidschian*, мтДНК, гаплотипы, Сибирь, р. Оленёк.

DOI: 10.31857/S0016675821070043

Сиговые рыбы (Teleostei: Salmoniformes: Coregonidae) являются доминирующими в пресноводных ихтиоценозах арктических и субарктических экосистем. Представители группы настоящих сига *Coregonus lavaretus sensu lato* являются одними из самых распространенных, и их ареал простирается от Северного моря до водоемов Северной Америки. Благодаря большому числу описанных аллопатрических и симпатрических форм/видов неясного статуса и происхождения сиг является модельным объектом в филогенетических и микроэволюционных исследованиях [1–9]. Большая часть форм/видов пыжьяновидных сига была описана для европейских водоемов [4, 10–12], тогда как в водоемах Сибирской Арктики их описано значительно меньше [13, 14]. В середине XX в. большая часть вновь обнаруженных в водоемах России форм/видов пыжьяновидных сига авторами обозначались как “natio”. К наиболее известным экологическим формам (natio) можно

отнести восточносибирского *C. l. pidschian* n. *brachymystax* и ледниково-равнинного *C. l. pidschian* n. *glacialis*, обитающих в арктических водоемах Западной и Центральной Якутии, юкагирского сига *C. l. pidschian* n. *jucagiricus* из водоемов бассейнов рек Колыма и Индигирка [2, 15, 16]. Для Норило-Пясинской системы озер описано несколько экологических форм/natio: сиг-могчегор *C. l. pidschian* n. *mokschechor*, сиг-хеню *C. l. pidschian* n. *ajakliensis* и сиг-чемогор *C. l. pidschian* n. *norilensis*. Из оз. Таймыр были описаны две формы/вида сига – озерная *C. l. pidschian* n. *taimyrensis* и озерно-речная *C. l. pidschian* n. *logaschevi* [17–19]. Позже было показано, что все разнообразие экологических форм/natio из бассейнов рек Сибирской Арктики можно свести к двум группировкам [20], большая часть различий между которыми приходится на форму тела. Крупный высокотельный сиг обитает в озерах и лиманах, а в руслах, в том числе и горных рек, обитает мелкий низкотельный сиг [9, 16,

20–22]. Предварительные исследования мтДНК сигов из бассейнов рек Анабар, Хатанга, оз. Кутарамакан и других водоемов п-ова Таймыр подтвердили существование двух форм [23].

В середине прошлого века из устья р. Оленёк (р. Буолкалах) В.С. Михиным была описана новая форма/natio – оленёкский сиг *C. l. pidschian natio oleneki* [24]. Согласно морфологическому анализу, эта форма достоверно отличается от енисейских и ленских пыжьяновидных сигов. В настоящее время при исследовании устья р. Оленёк были обнаружены формы/виды сигов, по внешним признакам схожие с сигами из устья р. Анабар и оз. Таймыр и определенные как восточносибирский и ледниково-равнинный. По всей видимости, В.С. Михин изучал локальную популяцию одной из этих форм. В то же время в среднем течении р. Оленёк, где, как ожидалось, обитает только восточносибирский сиг [9, 23], была обнаружена промежуточная форма, которая по внешним признакам хорошо отличается как от восточносибирского, так и от ледниково-равнинного сига.

Цель нашей работы – сравнительная характеристика различных форм/видов сигов из р. Оленёк, анализ филогенетических связей и выявление возможных механизмов происхождения экологических форм.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика района работ. Река Оленёк берет начало на Среднесибирском плоскогорье и протекает по границе Анабарского плато, огибая его с южной и восточной сторон (рис. 1). Длина реки составляет 2270 км, площадь бассейна 219000 км² [25]. С запада р. Оленёк примыкает к бассейну р. Анабар, с востока водораздел реки граничит с бассейном р. Лены. Верхнее течение р. Оленёк лежит в горных районах, где река имеет каменистое русло со значительными перекатами. Среднее течение реки характеризуется песчано-галечным руслом с глубокими плесами. В летнее время большая часть перекатов сильно мелеет.

Сбор материала и морфологический анализ. Из сиговых рыб в среднем течении р. Оленёк отмечены одна форма/вид пыжьяновидного сига *C. lava-retus* и тугун *C. tugin*. Лов пыжьяновидных сигов в устье р. Арга-Сала (68°27' с.ш.; 105°16' в.д.) и в р. Оленёк (устье р. Кысыл-Хая-Юряге) (71°34' с.ш.; 113°56' в.д.) проводили ставными сетями и неводом в период с 10 по 25 июля 2016 г. Из каждой точки было отобрано по 33 экз. сигов. Осенью этого же года из устья р. Оленёк в лабораторию было доставлено 6 экз. замороженных восточносибирских и 14 экз. ледниково-равнинных сигов (рис. 2). В качестве внешней группы использовали выборки восточносибирского и ледниково-равнинного сигов из р. Анабар [9]. Кроме того, в гене-

тическом анализе использовали последовательности гена *ND1* мтДНК ледниково-равнинных сигов из устья р. Попигаи и Оленёкской протоки дельты р. Лены. Морфологический анализ выполняли на основе цифровых изображений согласно описанной ранее методике [26]. В настоящей статье использованы общепринятые названия и обозначения [27, 28]. Признаки проверялись на нормальность распределения с помощью теста Андерсона–Дарлинга. Для сравнения средних величин использовали односторонний ANOVA и *U*-тест Манна–Уитни. Оценку достоверности между выборками проводили с помощью многомерного дисперсионного анализа MANOVA. Для обработки цифрового материала использовали статистический пакет Statistica v5. В качестве внешней группы использовали данные по симпатрическим сигам из р. Анабар и устья р. Оби [9].

Определение возраста рыб. Возраст рыб определяли по чешуе [29, 30]. Для этого чешую фотографировали с помощью цифрового фотоаппарата Canon Power Shot G7 под бинокулярным микроскопом Carl Zeiss Stemi 2000-с. Далее цифровое изображение обрабатывали в графическом редакторе Adobe Photoshop CS и подсчитывали годовые кольца. Для анализа возраста и темпа роста использовано 66 экз. сигов из среднего течения р. Оленёк. В качестве внешней группы использовали собственные данные по сигам из р. Анабар и данные Ф.Н. Кириллова [9, 16].

Генетический анализ. Общую геномную ДНК выделяли из фиксированной 96%-ным этанолом печени сигов фенольно-хлороформным методом [31]. Выделенную ДНК хранили при 4°C. Амплификацию фрагмента гена *ND1* мтДНК проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл с использованием разработанных внешних праймеров 5'-GGCCTAAGCCCTTTTCTCA-3' Forward и 5'-GAGGGGACTTGAACCCCTAT-3' Reverse [32]. Полученные продукты очищали с помощью набора реактивов “БИОСИЛИКА” (Новосибирск, Россия) и секвенировали как в прямом, так и в обратном направлении в компании “Синтол” (Москва, Россия, www.syntol.ru). В результате получены последовательности длиной в 1091 нуклеотидных оснований. Последовательности выравнивали с помощью алгоритма ClustalW, редактировали вручную, затем депонировали в базу данных GenBank (табл. 1).

Генетический полиморфизм, дифференциация и распространение гаплотипов. Для анализа генетического полиморфизма вычисляли: число полиморфных (сегрегирующих) сайтов (*S*), число гаплотипов (*h*), гаплотипическое разнообразие (H_d), нуклеотидное разнообразие (π), среднее число нуклеотидных различий (*k*). Расчеты выполнялись в программе DnaSP v5.10 [33]. Для оценки генеалогических связей между гаплотипами предполага-

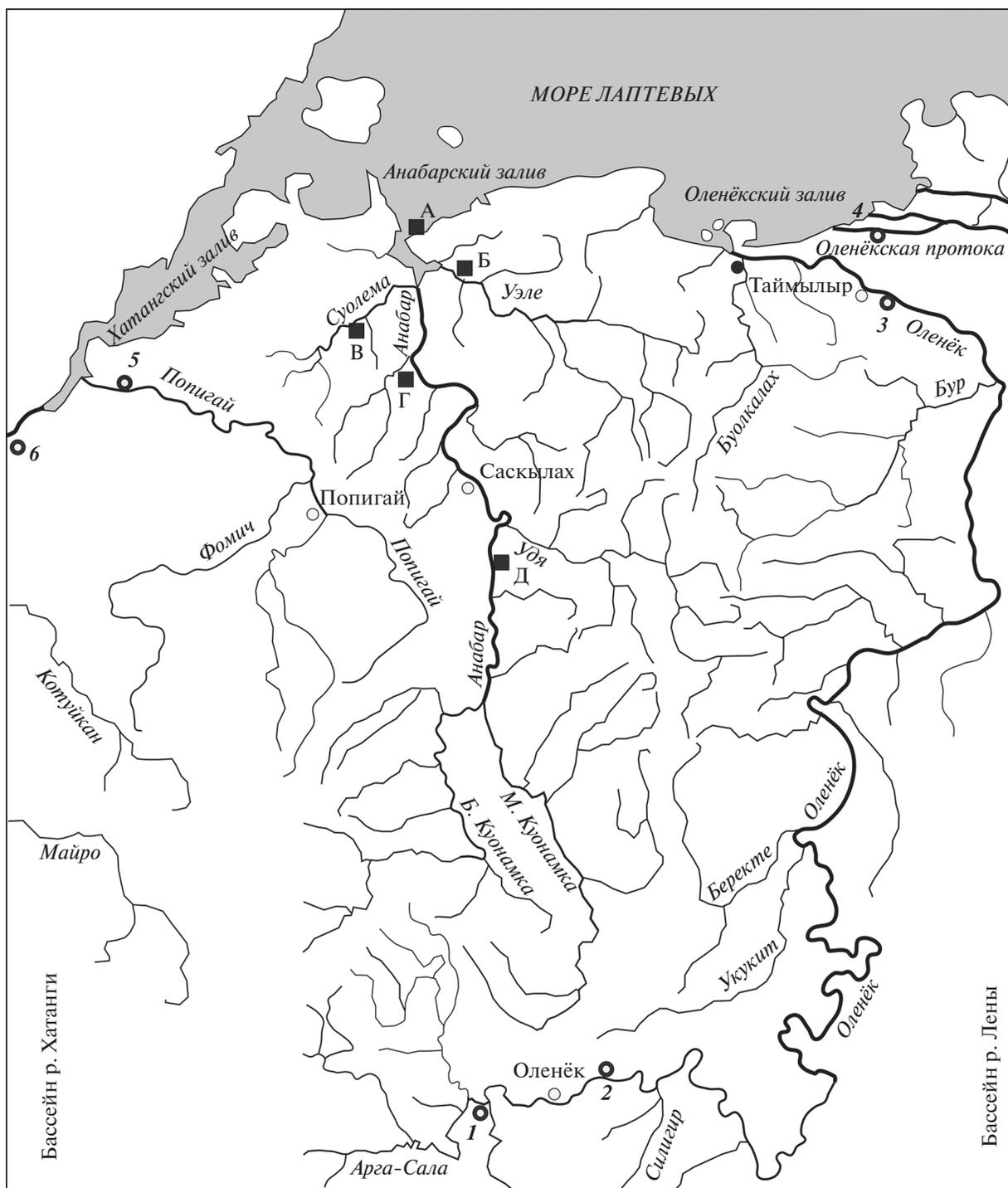


Рис. 1. Карта-схема бассейна р. Оленёк. 1–6 – места лова рыб. Черный круг в устье р. Оленёк – предполагаемое место сбора сигов В.С. Михиным; светлые кружки – населенные пункты; черные квадраты – места взятия проб на аллозимный анализ в р. Анабар: А – м. Хорго, Б – р. Уэ́ле, В – р. Суолема, Г – р. Поропуон, Д – р. Маят.

емых форм/видов сигов построили медианную сеть в программе Network v4.5 с помощью алгоритма медианного связывания (Median-Joining) [34]. Для построения сети кроме гаплотипов сигов из р. Оленёк, р. Попига́й, Оленёкской протоки

р. Лены использовали гаплотипы сигов из р. Анабар (KU948937–KU948950, KU948951–KU948962), р. Рассоха (KU948963–KU948966) притоков Нижней Оби, рек С. Сосьва (KU948973, KU948974), Сось (KU948971, KU948972), Войкар (KU948937,

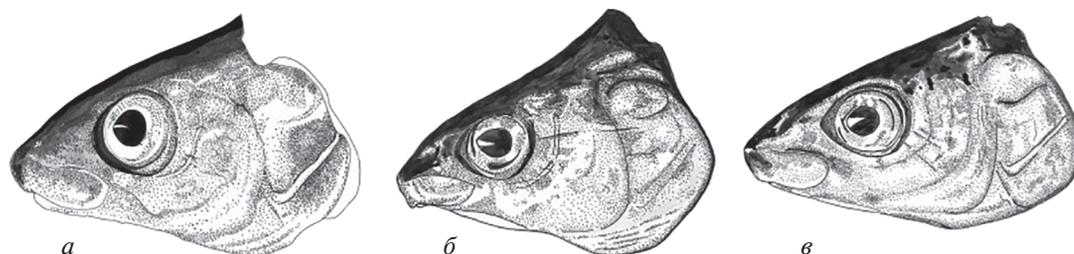


Рис. 2. Головы сига: из среднего течения р. Оленёк (а); ледниково-равнинный (*C. l. pidschian n. glacialis*) (б) и восточносибирский (*C. l. pidschian n. brachymystax*) (в) сига из р. Анабар [9]. Рисунок Н.А. Бочкарева.

KU948976, KU948977), Таз (KU948975), бассейна р. Енисей, р. Абакан (KJ742910–KJ742918, HM538404, HM538405, JN628999, NJ629000) и оз. Каракуль (HM538401–HM538403, KJ742909) [9, 23]. Для оценки степени межпопуляционной дифференциации были рассчитаны парные значения F_{ST} . Значения вероятности рассчитывались с использованием 10000 перестановок в программе ARLEQUIN v3.5.

Тесты на нейтральность и демография. Для оценки нейтральности эволюции были использованы тесты Таджиджи (Tajima's D) и Фу (Fu's F_s) [35–37]. Статистическая значимость была вычислена при 1000 реплик. Для выявления демографических параметров проведены тесты на нейтральность эволюции и проанализированы модели демографической и пространственной экспансии (mismatch distributions) [38]. Для подтверждения результатов использовали среднеквадратичное отклонение (SSD) и индекс шероховатости Харпендинга (r).

Аллозимный анализ. Методом электрофореза в полиакриламидном геле были изучены выборки из среднего течения р. Оленёк (66 экз.), из Оленёкской протоки дельты р. Лены (11) и участка вблизи устья р. Оленёк (с. Таймыль 8 экз.) по 30 локусам, контролирующим 13 ферментных систем. Визуализация экспрессии исследованных локусов проводилась в препаратах, приготовленных из мышц и печени рыб. Биохимические исследования проб проводились в соответствии с методами,

изложенными в работах [39, 40]. Статистическая обработка результатов выполнялась с использованием компьютерной программы BIOSYS-2 [41], вычислялись стандартные значения генетической вариабельности — доля полиморфных локусов (P , 99%-ный критерий) и средняя теоретически ожидаемая гетерозиготность (H_{exp}); межпопуляционные сравнения проводили по частотам аллелей полиморфных локусов с применением критерия χ^2 с поправкой на малую численность ряда исследованных выборок [42], а также путем вычисления генетических расстояний между выборками [43] и степени генетического обмена между ними по индексу F_{ST} [44]. Для проведения филогеографических сопоставлений сига-пыжьяна из р. Оленёк с ближайшими популяциями вида использованы аллозимные данные из ранее опубликованной работы по р. Анабар [45].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Экологическая характеристика сига р. Оленёк

В р. Оленёк сига обитают повсеместно, от верхнего течения до Оленёкского залива. В нижнем течении реки встречаются две формы/вида (восточносибирский и ледниково-равнинный), внешне идентичные сигам из р. Анабар. В среднем течении реки сиг концентрируется в глубоководных плесах. Популяция представлена по крайней мере 12 возрастными группами и характеризуется вы-

Таблица 1. Места сбора, координаты сбора, объем выборки, номера гаплотипов пыжьяновидных сига из некоторых водоемов Северо-Западной Якутии в GenBank

Места отлова рыб	n	Широта	Долгота	Номера последовательностей в GenBank
1. р. Оленёк (с. Таймыль)	24	72°37'	121°53'	MT885346–MT885361
2. р. Оленёк (среднее течение)	66	67°54'	105°16'	MT885362–MT885376
3. Оленёкская протока р. Лена	17	73°11'	122°14'	MT885382–MT885390
4. р. Попигай	8	72°57'	106°09'	MT885377–MT885381

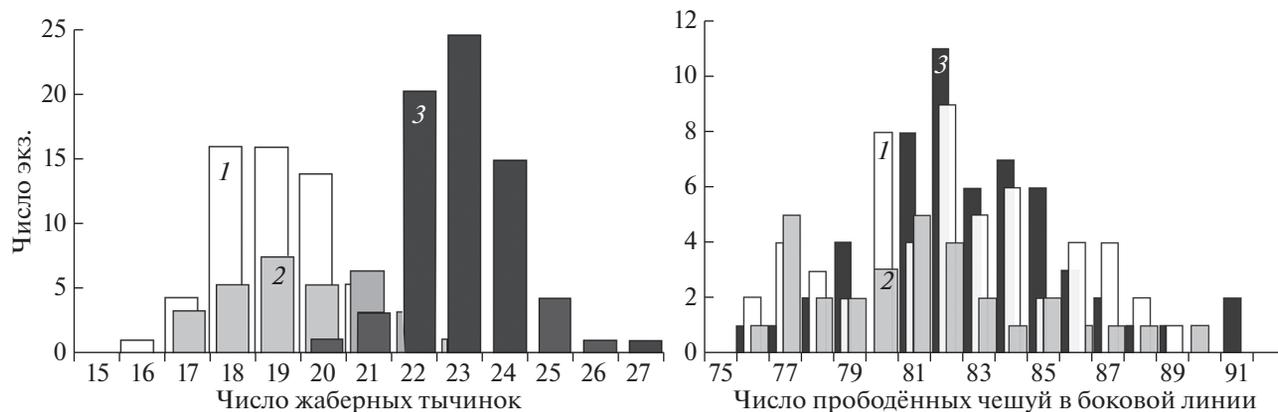


Рис. 3. Число жабрных тычинок и число прободённых чешуй в боковой линии. 1 – восточносибирский сиг из р. Анабар, 2 – ледниково-равнинный сиг из р. Анабар, 3 – сиг из среднего течения р. Оленёк.

сокой скоростью линейного роста. Крупные сиги в уловах встречаются достаточно часто, и популяция из среднего течения реки превосходит по скорости роста большинство популяций сигов из водоемов Якутии.

Морфологический анализ

Анализ числа жабрных тычинок на первой жаберной дуге и числа прободённых чешуй в боковой линии сигов из бассейна р. Оленёк показал, что они относятся к малотычинковым и малочешуйчатым формам/видам сигов (рис. 3). Согласно нашим данным, у восточносибирского сига из р. Оленёк (с. Таймылыр) в среднем 22.17 ± 0.47 жабрных тычинок и 82.14 ± 0.44 прободённых чешуй в боковой линии ($n = 9$). У ледниково-равнинных сигов, пойманных вблизи с. Таймылыр, жабрных тычинок 19.86 ± 0.57 , прободённых чешуй 81.64 ± 0.87 ($n = 15$). У пыжьяновидного сига из среднего течения р. Оленёк жабрных тычинок и прободённых чешуй в боковой линии несколько больше – 22.98 ± 0.16 ; 82.91 ± 0.41 . Многомерный дисперсион-

ный анализ (MANOVA) показал, что выборки восточносибирского, ледниково-равнинного сигов и сига из среднего течения р. Оленёк достоверно отличаются друг от друга (Wilk's $\Lambda = 0.3053$, $F = 9.61$, $df_1 = 31$, $df_2 = 131$) ($p < 0.001$). Однако попарное сравнение выявило незначительные различия ($p < 0.07$) между популяциями восточносибирского сига из нижнего течения и сига из среднего течения р. Оленёк.

Изменчивость митохондриальной ДНК

Анализ изменчивости мтДНК сигов из исследованных популяций показал, что все они характеризуются высокими, примерно равными показателями, но уровень полиморфизма выше в популяции сига из среднего течения р. Оленёк (табл. 2).

Филогенетические взаимоотношения

Реконструкция филогенетических взаимоотношений между популяциями сигов из водоемов Сибирской Арктики выявила две крупные гапло-

Таблица 2. Полиморфизм последовательности гена *ND1* мтДНК в популяциях пыжьяновидных сигов из некоторых водоемов Северо-Западной Якутии

Места отлова рыб	<i>n</i>	<i>S</i>	<i>h</i>	<i>H_d</i>	π	<i>k</i>
1. р. Оленёк (с.Таймылыр)	24	24	18	0.971	0.00444	4.326
2. р. Оленёк (среднее течение)	17	28	16	0.993	0.00729	7.101
3. р. Лена Оленёкская протока	17	17	15	0.985	0.00445	4.309
4. р. Попигай	8	11	7	0.964	0.00425	4.142
Для всех	66	52	52	0.990	0.00588	5.684

Примечание. *n* – число образцов, *S* – число полиморфных (сегрегирующих сайтов), *h* – число гаплотипов, *H_d* – гаплотипическое разнообразие, π – нуклеотидное разнообразие, *k* – среднее число нуклеотидных различий (на сайт).

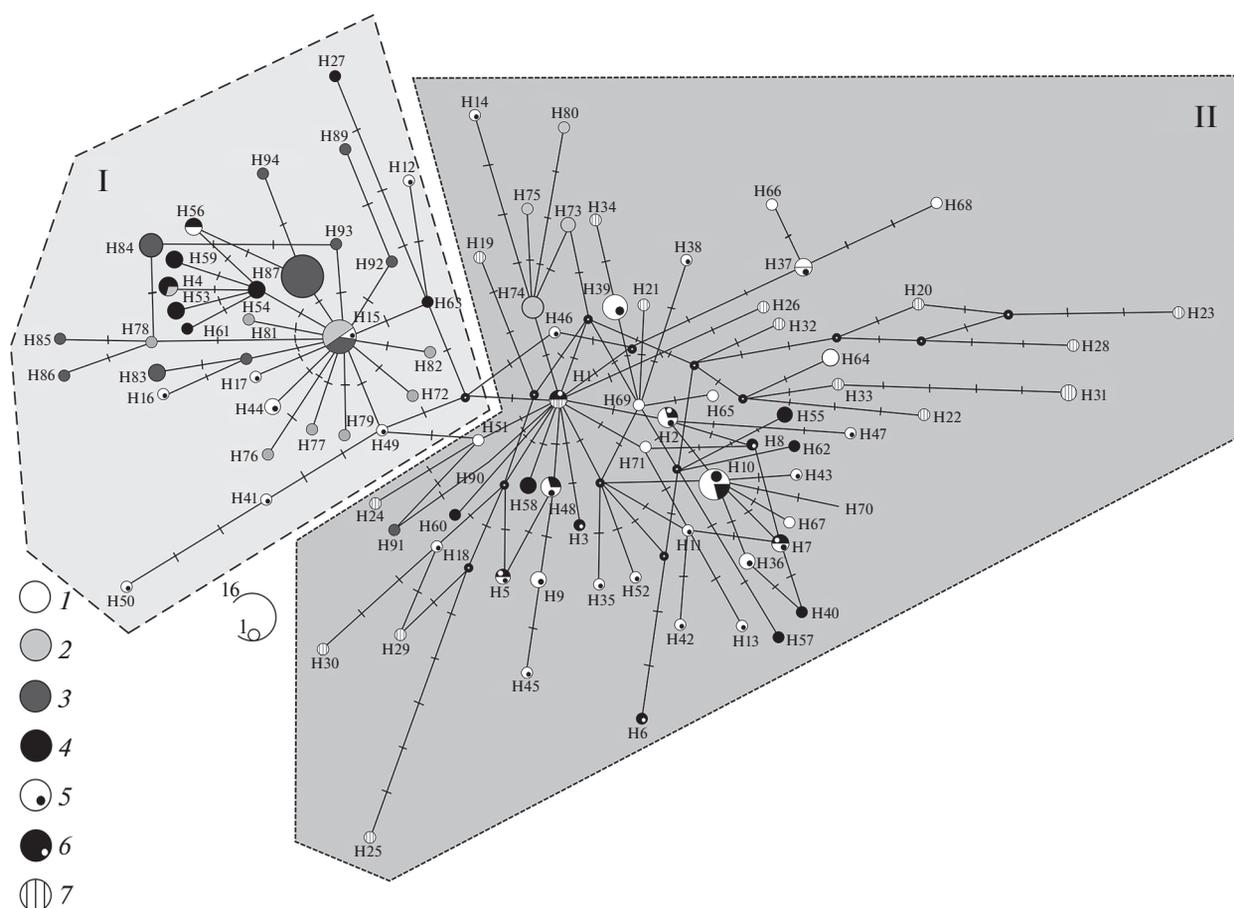


Рис. 4. Медианные сети гаплотипов сигов из водоемов Северо-Западной Якутии и п-ова Таймыр. I, II – гаплогруппы. Галотипы: 1 – ледниково-равнинного сига из р. Анабар; 2 – сига-пыжьяна из р. Обь; 3 – сига-пыжьяна из р. Енисей, 4 – восточносибирского сига из р. Анабар; 5 – ледниково-равнинного сига из р. Оленёк; 6 – восточносибирского сига из р. Оленёк; 7 – сига из р. Оленёк (среднее течение). Черточки на линиях связи – мутации. Мелкими черными кружками обозначены невыявленные гаплотипы. Диаметр кружков пропорционален числу обнаруженных особей, имеющих данный гаплотип.

группы (рис. 4). Основной гаплогруппы I являются звездообразные структуры с центральными гаплотипами сигов из рек Обь (H15), Енисей (H87) и Анабар (H54). Первая гаплогруппа связана со второй через 4–6 мутаций. Вторая гаплогруппа (II) имеет иную структуру и включает в себя множество удаленных друг от друга уникальных гаплотипов, в основном принадлежащих ледниково-равнинному сигу. В то же время в ней присутствует несколько мелких звездообразных структур гаплотипов сигов обского происхождения с минорными гаплотипами (H74) и оленёкского происхождения (H10) с минорными гаплотипами.

Для анализа генетической структуры разнообразия AMOVA группы были разделены согласно географическому принципу: сига из р. Анабар и р. Попигай, нижнее течение р. Оленёк (с. Таймыль) и сига из Оленёкской протоки р. Лены. Отдельную группу составили сига из среднего течения р. Оленёк. В результате было выявлено, что внутригрупповая изменчивость гораздо выше – 86.65%.

При изменении состава групп результаты AMOVA практически не изменялись (табл. 3). Попарное сравнение выборок выявило довольно низкие значения F_{ST} между сравниваемыми группировками (от 0 до 0.2010). Более высокие значения были обнаружены между удаленными группировками сигов из р. Попигай и среднего течения р. Оленёк (табл. 4). Тест на нейтральность эволюции Tajima's D в большинстве случаев принимает отрицательные и недостоверные значения. Тест Fu's F_S во всех случаях (за исключением выборки сигов из р. Попигай) характеризовался отрицательными и достоверными значениями (табл. 5). Тесты на нейтральность для всей суперпопуляции сигов продемонстрировали отрицательные достоверные значения. Анализ распределения частот гаплотипов выявил бимодальную картину для объединенной выборки всех популяций сига из среднего течения р. Оленёк. Но значения суммы квадратичного отклонения (SSD_{obs}) и индекса

Таблица 3. Результаты анализа молекулярной дисперсии AMOVA для популяций пыжьяновидных сига из трех регионов

Источник изменчивости	<i>d.f.</i>	Сумма квадратов	Дисперсия	Ф-статистики	%
Среди групп	2	28.377	0.269	F_{SC} : 0.04882	8.90
Среди популяций	2	9.683	0.134	F_{ST} : 0.13351	4.45
Внутри популяций	97	254.322	2.622	F_{CT} : 0.08904	86.65
Всего	101	292.382	3.025		

Таблица 4. Парные значения индекса фиксации F_{ST} для всех (согласно ANOVA) исследованных группировок сига из некоторых водоемов Северо-Западной Якутии [9]

Места отлова рыб	1	2	3	4
1. р. Оленёк (с. Таймылыр)	0			
2. р. Оленёк (среднее течение)	0.203 (0.000)	0		
3. р. Лена (Оленёкская протока)	-0.009 (0.575)	0.208 (0.000)	0	
4. р. Попигай	0.145 (0.002)	0.210 (0.000)	0.145 (0.002)	0
5. р. Анабар	0.052 (0.018)	0.163 (0.000)	0.053 (0.029)	0.128 (0.008)

Таблица 5. Тесты на нейтральность эволюции для изучаемых популяций сига из р. Оленёк и сопредельных территорий [9]

Места отлова рыб	<i>n</i>	Tajima's <i>D</i>	<i>p</i>	Fu's <i>F_s</i>	<i>p</i>
1. р. Оленёк (с. Таймылыр)	24	-1.211	0.090	-10.716	0.001
2. р. Оленёк (среднее течение)	17	-0.577	0.305	-8.827	0.001
3. р. Лена (Оленёкская протока)	17	-0.558	0.336	-10.051	0.001
4. р. Попигай	8	-0.117	0.466	-2.370	0.059
5. р. Анабар	36	-0.859	0.226	-12,246	0.000
Для всех	102	-1.670	0.018	-58.534	0.000

Харпендинга (*r*) оказались недостоверными, поэтому нельзя сказать, какой из моделей – пространственной или демографической экспансии – соответствует распределение частот гаплотипов (demographic expansion model: $SSD_{obs} = 0.0215$, $p = 0.048$; $r = 0.020$, $p = 0.770$) (spatial expansion model: $SSD_{obs} = 0.0068$, $p = 0.310$; $r = 0.020$, $p = 0.430$).

Аллозимный анализ

При исследовании выборок сига из р. Оленёк и из Оленёкской протоки дельты р. Лены не было обнаружено генетической вариабельности по следующим локусам: *sAAT-1**, *sAAT-2**, *CK-A2**, *ESTD**, *G3PDH-2**, *GPI-A1**, *GPI-A2**, *GPI-B1**, *GPI-B2**, *IDDH-1**, *IDHP-3**, *LDH-A2**, *LDH-B1**, *MDH-A1**, *MDH-A2**, *MDH-B2**, *sMEP-4**, *PGDH**,

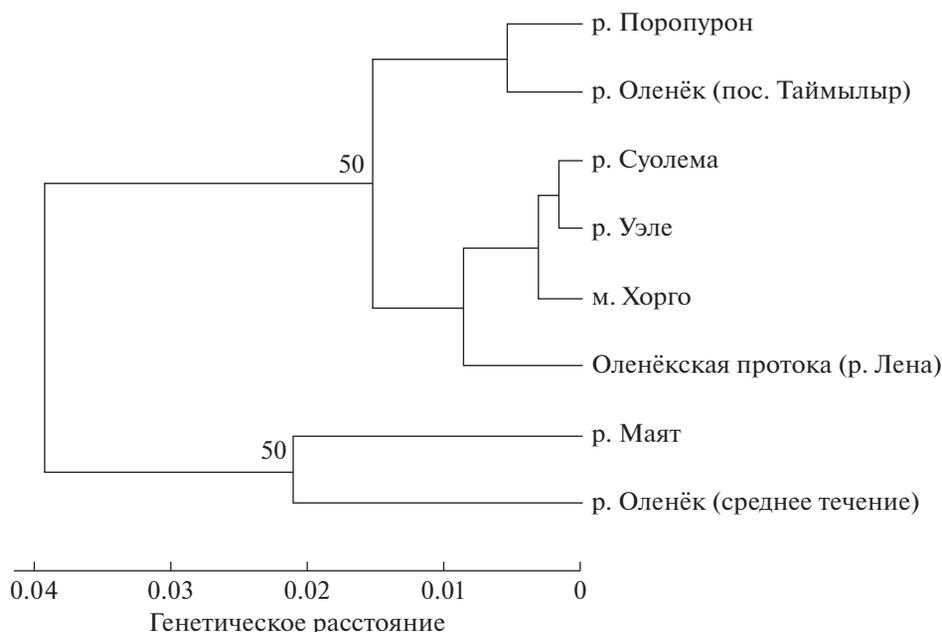
*PGM-4**, *sSOD**, *mSOD**. Статистически значимый вклад в дифференциацию между выборками из р. Оленёк и Оленёкской протоки дельты р. Лены по аллельным частотам внесли следующие локусы: *CK-A1** ($p < 0.0001$), *G3PDH-1** ($p = 0.0153$), *IDDH-2** ($p < 0.0001$), *sIDHP-4** ($p = 0.0202$), *LDH-A1** ($p = 0.0011$), *MDH-B1** ($p = 0.0086$), *MEP-3** ($p = 0.0148$). Неравновесность генотипических частот в выборках была установлена для двух полиморфных локусов: *CK-A1** – р-н с. Таймылыр ($p = 0.005$), р. Оленёк ($p < 0.0001$); *IDDH-2** – р. Оленёк ($p < 0.0001$). Минимальными величинами уровня полиморфизма и средней теоретически ожидаемой гетерозиготности характеризовалась выборка из района с. Таймылыр ($p = 16.7\%$ и $H_{exp} = 0.060$), максимальные значения аналогичных показателей оказались в выборке сига из

Таблица 6. Матрица генетических расстояний D_N [45] (под диагональю) и уровни индекса фиксации F_{ST} [46] (над диагональю) между сравниваемыми популяциями сига из р. Оленёк и Оленёкской протоки дельты р. Лены

Популяции	1	2	3	4	5	6	7	8
1. р. Оленёк (среднее течение)	—	0.073	0.120	0.150	0.201	0.164	0.093	0.119
2. р. Оленёк (с. Таймылыр)	0.022	—	0.091	0.082	0.080	0.046	0.062	0.138
3. р. Лена (Оленёкская протока)	0.037	0.010	—	0.082	0.064	0.029	0.081	0.248
4. м. Хорго	0.042	0.010	0.011	—	0.032	0.021	0.092	0.263
5. р. Уэле	0.041	0.016	0.011	0.004	—	0.017	0.061	0.291
6. р. Суолема	0.032	0.009	0.004	0.002	0.001	—	0.041	0.256
7. р. Поропурон	0.046	0.005	0.014	0.019	0.024	0.021	—	0.140
8. р. Маят	0.020	0.023	0.048	0.051	0.056	0.050	0.022	—

Оленёкской протоки дельты р. Лены ($P = 23.3\%$ и $H_{\text{exp}} = 0.077$). Все индексы генетической вариативности выборок из р. Оленёк и Оленёкской протоки находились в границах крайних значений, выявленных для выборок из р. Анабар ($16.7\% < P < 33.3\%$ и $0.054 < H_{\text{exp}} < 0.080$). При сопоставлении между собой выборок сига из р. Оленёк и Оленёкской протоки генетически наиболее обособленной оказалась выборка из среднего течения реки (р-н с. Оленёк): расстояния между ней и выборками из нижнего течения реки и из смежного речного бассейна (р. Лена) составили $D_N = 0.022$ и $D_N = 0.037$ соответственно. При этом значения индексов фиксации между тремя исследуемыми

выборками находились в пределах $0.073 < F_{ST} < 0.120$, демонстрируя минимальную величину между сигами из общей речной системы — р. Оленёк. Между двумя выборками из нижнего течения рек Оленёк и Лена (Оленёкская протока) достоверные различия по частотам аллелей были найдены только по двум локусам из восьми полиморфных — *СК-А1** ($p = 0.0018$) и *IDHP-4** ($p = 0.0041$), что обуславливает сравнительную генетическую однородность сига из нижних участков смежных водотоков ($D_N = 0.010$, $F_{ST} = 0.091$) (табл. 6). Среди четырех выборок из нижнего течения р. Анабар и Анабарского залива достоверные различия по частотам аллелей были найдены толь-

**Рис. 5.** UPGMA-дендрограмма (Nei, 1978) генетических расстояний исследованных выборок сига по аллозимным локусам. Бутстреп-значения приведены только для уровня значимости более 50%.

ко по двум локусам из 11 полиморфных – *IDDH-2** ($p = 0.0373$) и *PGM-3** ($p = 0.0360$), что подтверждает сравнительную генетическую близость сига из нижних участков реки ($0.001 < D_N < 0.024$, $0.017 < F_{ST} < 0.092$). Генетически наиболее обособленными оказались выборка из среднего течения реки (р-н устья р. Маят) – с одной стороны, и четыре выборки из нижнего течения реки (включая Анабарский залив) – с другой: усредненное генетическое расстояние между ними составило $D_N = 0.045$ при значениях индексов фиксации $0.140 < F_{ST} < 0.291$.

На дендрограмме все исследованные выборки сигов из рек Оленёк, Лена (Оленёкская протока) и Анабар группировались в соответствии удаленности от моря: к кластеру выборок из самых нижних частей рек и морских заливов (Оленёкская протока, мыс Хорго, р. Уэле, р. Суолема) примыкал кластер выборок, расположенных в нескольких десятках километров вверх по рекам Оленёк и Анабар (с. Таймылыр и р. Поропуон соответственно). Третий, наиболее отстоящий от остальных кластер был образован выборками из средних течений рек Оленёк и Анабар, причем генетические различия между выборками из р-нов с. Оленёк и р. Маят оказались сравнительно высокими, $D_N = 0.020$ (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Экология сигов

Исследование экологии сигов продемонстрировало относительную изолированность обитающих в р. Оленёк экологических форм. Очевидно, что типичные ледниково-равнинные сиги, обитающие в нижнем течении реки и лимане, высоко вверх по течению не мигрируют. Как показывает анализ сигов из р. Анабар, восточносибирские сиги в нижнем течении и в лимане встречаются редко [9]. Сравнение динамики роста различных форм сигов из арктической зоны Сибири показало, что сиг из среднего течения р. Оленёк имеет относительно высокий темп роста, близкий к росту ледниково-равнинных сигов. Это, кроме генетической составляющей, можно объяснить и спецификой р. Оленёк (обилие бентоса на глубоких многочисленных плесах).

Морфология

Анализ меристических признаков сигов из р. Оленёк показал, что обе изученные формы/популяции относятся к малотычинковым и малочешуйчатым формам/видам, к которым относится большая часть популяций сигов из водоемов Сибирской Арктики. Результаты наших исследований незначительно отличаются от результатов, приведенных В.С. Михиным для сигов устья

р. Буолкалаха: 21.86 жаберных тычинок и 81.78 прободённых чешуй в боковой линии [24]. Несмотря на то что визуально (по профилю головы) выборки восточносибирского сига из нижнего течения р. Оленёк и сиг среднего течения реки хорошо различимы, достоверных статистических различий между ними не обнаружено. Возможно, что такой результат связан с незначительной по величине выборкой восточносибирских сигов из нижнего течения р. Оленёк.

Генетика

Согласно структуре медианной сети в популяциях сигов из р. Оленёк присутствуют гаплотипы нескольких филогенетических линий. Гаплогруппа I характеризуется относительно простой структурой сети, наличием нескольких звездообразных структур с многочисленными альтернативными связями. Такая структура свидетельствует об относительно длительной эволюции объединенных в нее популяций сигов в изменчивых условиях при частых изменениях численности, и/или при наличии множества смежных рефугиумов, существовавших одновременно. Гаплогруппа II характеризуется более сложной структурой, наличием нескольких небольших центров, сформированных обскими и анабарскими гаплотипами восточносибирских сигов. В этой гаплогруппе присутствует множество уникальных гаплотипов, отстоящих друг от друга на 1–3 мутационных шага, что формирует слабо связанную сеть. Такая структура свидетельствует о древности гаплотипов, и эти гаплотипы, как правило, принадлежат ледниково-равнинным сигам.

Тесты на нейтральность эволюции, демография

Индексы на нейтральность эволюции принимают отрицательные значения в случае экспансивного роста популяции или в случае действия отрицательного отбора. Высокие, достоверные и отрицательные значения тестов F_u 's F_s могут свидетельствовать о продолжающейся гибридизации в популяциях сигов из р. Оленёк и пространственной экспансии. Недостоверные значения среднеквадратического отклонения и индекса шероховатости Харпендинга не позволяют отдать предпочтение той или иной модели экспансии – демографической, или пространственной. В отношении сигов из нижнего течения р. Оленёк можно принять модель пространственной экспансии, хотя, вероятнее всего, к популяции сигов из среднего течения р. Оленёк применимы обе модели. Низкие значения F_{ST} свидетельствуют о потоке генов, который существует (или существовал в недавнем прошлом) между морфологически дистантными популяциями. Отрицательные значения тестов на нейтральность эволюции и показатели SSD_{obs} и r , скорее всего,

указывают на демографическую экспансию сигов в бассейне р. Оленёк, которая сопровождается низкой частотой периферических гаплотипов.

Морфологическое и генетическое соответствие форм

Несмотря на внешнюю схожесть сигов среднего течения р. Оленёк с **восточносибирскими** сигами из устья р. Оленёк, из 17 проанализированных образцов сигов из среднего течения реки 16 имели мтДНК **ледниково-равнинных** (94%) и только один экземпляр имел мтДНК восточносибирских сигов (6% совпадений по внешнему облику и по мтДНК). В отличие от сигов из р. Анабар почти вся популяция сигов из среднего течения р. Оленёк характеризуется мтДНК ледниково-равнинного сига, тогда как по морфологическим признакам они ближе к восточносибирским сигам. Из девяти сигов из нижнего течения р. Оленёк, определенных как **восточносибирские**, три несли мтДНК восточносибирских сигов, а шесть — ледниково-равнинных (33% соответствия). Из 40 сигов из нижнего течения рек Оленёк, Попигаи и Оленёкской протоки р. Лены, определенных по морфологическим признакам как ледниково-равнинные, 31 несли мтДНК ледниково-равнинных (77.5% совпадений) и 9 экз. — восточносибирских. Близкую степень гибридизации мы отмечали у сигов из устья р. Анабар (80% совпадений). В то же время в удаленных от побережья моря популяциях сигов из оз. Кутарамакан (бассейн р. Енисей) степень гибридизации была уже значительно выше, и классификация по внешним признакам и анализу мтДНК составляла 50%.

Аллозимный анализ

Значительная дифференциация выборок из системы р. Анабар по аллозимным маркерам (как и по мтДНК) хорошо согласовалась с приуроченностью исследованных экологических форм к определенным участкам реки. Так, наибольшие генетические различия по частотам аллелей полиморфных локусов (вплоть до смены доминирующих аллелей по локусам *СК-А1** и *IDDH-2**) наблюдались между выборками из низовьев реки, представленными преимущественно ледниково-равнинными сигами и выборкой из среднего течения реки, в которой отмечались только восточносибирские сиги. Генетическое расстояние между этими группами составляло $D_N = 0.045$ [45]. Несмотря на большую географическую разобщенность исследованных выборок сига из нижнего и среднего течения р. Оленёк, генетическая дифференциация между ними была выражена в 2 раза слабее, чем в р. Анабар, $D_N = 0.022$. Тем не менее, степень генетической дифференциации сига в пределах рек Анабар и Оленёк значительно пре-

вышает аналогичные оценки, полученные для популяций из других водоемов Европы и Западной Сибири, что, по всей видимости, связано с особенностями эволюции и расселения филогенетических линий вида в период нижнечетвертичных оледенений [39, 46–48].

Показано, что обширные территории Европы и Западной Сибири вплоть до п-ова Таймыр и плато Путорана находились в зоне влияния повторяющихся волн оледенений нижнего плейстоцена [49]. Вдоль кромок протяженных ледников существовали обширные приледниковые озера, объемы которых превышали объемы наиболее крупных ныне существующих пресноводных водоемов мира [50]. За счет пульсации приледниковых водоемов, их разобщения или объединения в зависимости от стадии продвижения/отступления ледника на материк, обитающие в них географически изолированные формы/виды сига могли расселяться на значительные территории. В результате повторяющихся событий оледенений в Европе несколько филогенетических линий сига перемешались настолько сильно, что практически в каждой исследуемой популяции можно найти следы ее происхождения в результате гибридизации нескольких приледниковых рас [8, 46, 51]. Именно поэтому современные популяции сига в Европейской Субарктике демонстрируют широкую экологическую и морфологическую пластичность при относительно слабой генетической дифференциации рецентных популяций. Субарктические водоемы бассейна моря Лаптевых и далее на восток непосредственно событиями четвертичных оледенений практически не затрагивались, а значит популяции сига из северных рек могли поддерживаться в неизменном состоянии на протяжении многих тысячелетий. Однако популяции сига из рек Анабар и Оленёк, расположенные в относительной близости от края покровных ледников Зырянского и Каргинского оледенений, не могли не испытать влияния от интенсивного расселения сигов из рефугиумов с запада. Мы полагаем, что экспансия восточносибирского сига происходила, в том числе, и вдоль арктического побережья. Расселение этой формы хорошо прослеживается посредством морфогенетического анализа сигов из бассейнов рек Обь и Анабар и Хантайского озера [9, 23]. Противоречия в диагностике в выборке сига из среднего течения р. Оленёк по морфологическим и генетическим (мтДНК) признакам, а также результаты аллозимного анализа сигов из смежных речных систем Оленёк и Анабар предполагают ту или иную степень гибридизации двух экологических форм/видов сигов на значительном протяжении реки. Повышенные уровни параметров генетической вариабельности (P , H_{exp}) по аллозимным маркерам у сигов из среднего течения р. Оленёк по сравнению с выборкой из среднего течения р. Анабар, а

также достаточно большое генетическое расстояние между ними ($D_N = 0.020$), косвенным образом подтверждают более высокий уровень смешения восточносибирского и ледниково-равнинного сига в системе р. Оленёк.

Река Оленёк, несмотря на значительную протяженность, является рекой маловодной и состоит из множества глубоких плесов, связанных друг с другом мелководными перекатами. Таким образом, гидрология реки соответствует экологической нише, занимаемой популяциями ледниково-равнинных сигов, характерными биотопами которых являются озера и лиманы рек, впадающих в моря Северного Ледовитого океана, от бассейна р. Обь до бассейна р. Колымы. На момент вселения восточносибирского сига в русло р. Оленёк, по всей видимости, уже обитали популяции ледниково-равнинного сига. В результате проникновения восточносибирских сигов в бассейн р. Оленёк и гибридизации с местным ледниково-равнинным сигом сформировался новый облик, но гибридизация почти не повлияла на структуру мтДНК обитавших в реке сигов. При этом по аллозимным маркерам гибридная форма сига из среднего течения р. Оленёк демонстрирует высокое родство с восточносибирским сигом. Данное явление, по-видимому, связано с адаптивной природой наследственной изоферментной изменчивости, проявившейся в отборе в пользу тех качеств обменных процессов у рыб, которые имеют преимущество в условиях перехода равнинного водотока в реку с большим количеством порогов и перекатов, характерных для верхних участков р. Оленёк — типичных мест обитания восточносибирского сига.

Исследование поддержано Программой фундаментальных научных исследований (ФНИ) государственных академий наук на 2013–2020 гг., проект № VI AAAA-A16-116121410119-4, и региональным грантом 18-45-140053 p_a.

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Järvi T.H. Über die arten und formen der koregonen s. str. in Finnland // Acta Zoologica Fennica Helsingforsiae: Societas pro fauna and flora Fennica. 1928. 259 p.
2. Берг Л.С. Рыбы пресных вод СССР и сопредельных стран. Ч. I. М.: Изд-во АН СССР, 1948. 468 с.
3. Steinmann P. Monographie der schweizerisches Koregonen. Beitrag zum Problem der Entstehung von neuen Arten // Schweizerische Z. Hydrologie. 1951. V. 13. P. 54–155.
4. Правдин И.Ф. Сиги водоемов Карело-Финской ССР. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1954. 324 с.
5. Svärdson G. The coregonid problem. VI. The Palearctic species and their intergrades // Report of the Institute of Freshwater Research Drottningholm. 1957. P. 267–356.
6. Bernatchez L., Chouinard A., Lu G. Integrating molecular genetics and ecology in studies of adaptive radiation: whitefish, *Coregonus* sp., as a case study // Biol. J. Linn Soc. 1999. V. 68. P. 173–194.
7. Østbye K., Næsje T.F., Bernatchez L. et al. Morphological divergence and origin of sympatric populations of European whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) in Lake Femund, Norway // J. Evol. Biol. 2004. V. 18. P. 683–702. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2004.00844.x>
8. Østbye K., Bernatchez L., Næsje T.F. et al. Evolutionary history of the European whitefish *Coregonus lavaretus* (L.) species complex as inferred from mtDNA phylogeography and gill-raker numbers // Mol. Ecol. 2005. V. 14. P. 4371–4387.
9. Бочкарёв Н.А., Зуйкова Е.И., Пестрякова Л.А. и др. Сиг-пыжьян (*Coregonus lavaretus pidschian*, Coregonidae) реки Анабар // Генетика. 2018. Т. 54. № 9. С. 1057–1067. <https://doi.org/10.17816/ecogen15320-26>
10. Решетников Ю.С. Экология и систематика сиговых рыб. М.: Наука, 1980. 300 с.
11. Kottelat M., Freyhof J. Handbook of European Freshwater Fishes. Cornol Switzerland–Berlin Germany, 2007. 640 p.
12. Богуцкая Н.Г., Насека А.М. Каталог бесчелюстных и рыб пресных и солоноватых вод России с номенклатурными и таксономическими комментариями. СПб.: ГосНИОРХ, 2004. 389 с.
13. Скрябин А.Г. Сиговые рыбы юга Сибири. Новосибирск: Наука, 1979. 229 с.
14. Бочкарев Н.А. Экология, систематика, популяционная и внутривидовая структура сигов рода *Coregonus* (Pisces: Coregonidae) Телецкого озера: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск, 2000. 24 с.
15. Международный кодекс зоологической номенклатуры. Изд. 4-е. Принят Международ. союзом биол. наук: пер. с англ. и фр. Второе исправленное изд. русского перевода. М.: Т-во науч. изд. КМК, 2004. 223 с.
16. Кириллов Ф.Н. Рыбы Якутии. М.: Наука, 1972. 359 с.
17. Остроумов Н.А. Рыбы и рыбный промысел р. Пясины // Тр. Полярной комиссии. 1937. Т. 30. С. 7–114.
18. Логашев М.В. Озеро Мелкое и его рыбохозяйственное значение // Рыбохозяйственное значение норильских озер // Тр. Ин-та полярного земледелия, животноводства и промыслового хоз-ва. Л.; М.; 1940. Вып. 11. С. 7–71.
19. Михин В.С. Рыбы озера Таймыр и Таймырской губы // Изв. ВНИОРХ. 1955. Т. 35. С. 5–43.
20. Романов В.И., Зуйкова Е.И., Бочкарев Н.А. Морфологическая и экологическая дифференциация симпатрических сигов рода *Coregonus* из оз. Таймыр // Сиб. экол. журн. 2016. № 9. С. 290–296. <https://doi.org/10.15372/SEJ20160306>
21. Романов В.И., Бочкарев Н.А. К вопросу о статусе экологических форм сигов *Coregonus lavaretus pidschian*

- schian* Таймырского озера // Вестн. ТГПУ. 2009. Вып. 11(89). С. 186–193.
22. Бочкарев Н.А., Зуйкова Е.И., Политов В.Д. Таксономический статус и происхождение некоторых экологических форм сигов вида *Coregonus lavaretus* (L.) из водоемов Сибири // Генетика. 2017. Т. 53. № 8. С. 922–932. <https://doi.org/10.17816/ecogen15231-43>
 23. Бочкарёв Н.А., Зуйкова Е.И., Романов В.И. и др. Морфологическая и генетическая изменчивость симпатрических сигов комплекса *Coregonus lavaretus pidschian* из оз. Кутарамакан Хантайской гидросистемы (п-ов Таймыр) // Генетика. 2020. Т. 56. № 5. С. 571–583. <https://doi.org/10.31857/S001667582005033>
 24. Михин В.С. Сиг-пыжьян реки Оленёк // Вопр. ихтиологии. 1959. Вып. 13. С. 71–74.
 25. Чистяков Г.Е. Водные ресурсы рек Якутии. М.: Наука, 1964. 255 с.
 26. Бочкарёв Н.А., Зуйкова Е.И., Политов В.Д. Дополнительные возможности сбора и регистрации морфологических данных у рыб // Биология, биотехника разведения и состояние запасов сиговых рыб. Тюмень, 2013. С. 32–36.
 27. Bochkarev N.A., Zuykova E.I., Abramov S.A. et al. Morphological, biological and mtDNA sequences variation of coregonid species from the Baunt Lake system (the Vitim River basin) // Adv. Limnol. 2013. V. 64. P. 257–277.
 28. Правдин И.Ф. Некоторые вопросы методики ихтиологических исследований. Определение линейных размеров рыб. Изв. К.-Ф. фил. АН СССР, 1949. № 4. С. 31–42.
 29. Чугунова Н.И. Руководство по изучению возраста и роста рыб. М.: Изд-во АН СССР, 1959. 163 с.
 30. Мина М.В. Рост животных: Анализ на уровне организма. М.: Наука, 1976. 291 с.
 31. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 2344 p.
 32. Bochkarev N.A., Zuykova E.I., Katokhin A.V. Morphology and mitochondrial DNA variation of the Siberian white-fish *Coregonus lavaretus pidschian* (Gmelin) in the up-stream water bodies of the Ob and Yenisei rivers // Evol. Ecol. 2011. V. 25. P. 557–572. <https://doi.org/10.1007/s10682-010-9437-7>
 33. Librado P., Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // Bioinformatics. 2009. V. 25. P. 1451–1452.
 34. Bandelt H.J., Forster P., Röhl A. Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Boil. Evol. 1999. V. 16. P. 37–48.
 35. Excoffier L., Smouse P.E. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data // Genetics. 1992. V. 131. P. 479–491.
 36. Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism // Genetics. 1989. V. 123(3). P. 585–595.
 37. Fu Y.X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection // Genetics. 1997. V. 147. P. 915–925.
 38. Excoffier L., Laval G., Schneider S. Arlequin version 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis // Evol. Bioinform. Online. 2005. P. 47–50.
 39. Sendek D.S. Electrophoretic studies of Coregonid fishes from across Russia // Adv. in Limnology. 2002. V. 57. P. 35–55.
 40. Sendek D.S., Ivanov Ye.V., Khodulov V.V. et al. Genetic differentiation of coregonids populations in Subarctic areas // Adv. in Limnology. 2013. V. 64. P. 223–246. <https://doi.org/10.1127/1612-166X/2013/0064-0014>
 41. Black W.C. BIOSYS-2. A computer program for the analysis of allelic variation in genetics. IY: Colorado State University, Department of Microbiology, 1997.
 42. Levene H. On a matching problem arising in genetics // Ann. Math. Stat. 1949. V. 20. P. 91–94. <https://doi.org/10.1214/aoms/1177730093>
 43. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // Genetics. 1978. V. 89. P. 583–590.
 44. Wright S. Evolution and the Genetics of Population Variability Within and Among Natural Populations. Chicago; Illinois: Univ. Chicago Press, 1978. V. 4. 580 p.
 45. Сендек Д.С., Иванов Е.В. О причинах генетической неоднородности сига-пыжьяна *Coregonus lavaretus pidschian* реки Анабар // Экол. генетика. 2017. Т. 15. № 3. С. 20–26. <https://doi.org/10.17816/ecogen15320-26>
 46. Sendek D.S. The origin of sympatric forms of European whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) in Lake Ladoga based on comparative genetic analysis of populations in North-West Russia // Ann. Zool. Fennici. 2004. V. 41. P. 25–39.
 47. Sendek D.S., Novoselov A.P., Studenov I.I. et al. The origin of Coregonid fishes of the White Sea Kuloi Plateau // Adv. in Limnology. 2011. V. 63. P. 209–227. <https://doi.org/10.11277/1612-166X/2013/0064-0014>
 48. Сендек Д.С., Новоселов А.П., Бознак Э.И. Генетическая дифференциация сиговых рыб в реке Печоре // Сиб. экол. журн. 2016. Т. 23. № 2. С. 194–201. <https://doi.org/10.15372/SEJ20160203>
 49. Svendsen J.I., Alexanderson H., Astakhov V.I. et al. Late Quaternary ice sheet history of northern Eurasia // Quat. Sci. Rev. 2004. V. 23. P. 1229–1271. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2003.12.008>
 50. Mangerud J., Jakobsson M., Alexanderson H. et al. Ice-dammed lakes and rerouting of the drainage of northern Eurasia during the Last Glaciation // Quat. Sci. Rev. 2004. V. 23(11–13). P. 1313–1332. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2003.12.009>
 51. Ильмаст Н.В., Сендек Д.С., Титов и др. К вопросу о дифференциации экологических форм/подвидов сига *Coregonus lavaretus* озера Каменное // Уч. зап. Петрозаводского гос. ун-та. 2016. Т. 4. С. 42–53.

Population Structure of Whitefishes *Coregonus lavaretus pidschian* from the Olenek River: Revisiting the Origin of Ecological Forms

N. A. Bochkarev^{a,*}, D. S. Sendek^b, E. I. Zuykova^a, L. A. Pestryakova^c, E. S. Zakharov^c,
N. N. Zakharova^c, L. P. Koryakina^d, and D. V. Politov^e

^a*Institute of Animal Systematics and Ecology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630091 Russia*

^b*State Research Institute on Lake and River Fishery, St. Petersburg, 199053 Russia*

^c*Ammosov North-East Federal University, Yakutsk, 677980 Russia*

^d*Arctic State Agrotechnology University, Yakutsk, 677007 Russia*

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

*e-mail: ih@eco.nsc.ru

The results of morphogenetic analysis and data on the growth rate of sympatric forms/species of whitefish of the *Coregonus lavaretus pidschian* complex (*Coregonus pidschian*) from the Olenek River basin are presented, where V.S. Mikhin previously described one of the most famous in the Russian literature “ecological forms” of whitefish. It has been established that in the Olenek River basin inhabit three morphologically different “ecological forms/species” of whitefish, two of which are distributed in the estuary of river and are identified as *C. lavaretus pidschian* n. *brachymystax* и *C. lavaretus pidschian* n. *glacialis*. The third form was found in the middle part of the river. It has been shown that the studied forms/species have a similar numbers of gill rakers on the first brachial arch and perforated scales in the lateral line, but differ in average size and appearance. The analysis of variability of the *ND1* gene of the mtDNA showed that whitefishes belong to various phylogenetic lineages which are earlier revealed in water bodies of the Taimyr Peninsula. Despite the external similarity with east-Siberian whitefishes, the mtDNA of glacial-plain whitefishes were found in the whitefishes from the middle course of the Olenek River. Moreover, according to allozyme analysis, the studied sample from the middle course of the river has a greater similarity with east-Siberian whitefishes. This discordance seems to be associated with oncoming dispersion and hybridization between forms/species, as well as with the adaptive nature of hereditary of isoenzyme variability.

Keywords: sympatric whitefish, ecological form, *C. lavaretus pidschian*, mtDNA, haplotypes, Siberia, Olenek River.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ФИЛОГЕНИЯ ПУХОВЫХ КОЗ ЦЕНТРАЛЬНОЙ И СРЕДНЕЙ АЗИИ

© 2021 г. С. В. Бекетов^{1, *}, А. К. Пискунов¹, В. Н. Воронкова¹, С. Н. Петров², В. Р. Харзинова²,
А. В. Доцев², Н. А. Зиновьева², М. И. Селионова³, Ю. А. Столповский¹

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

²Федеральный исследовательский центр – ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста,
Московская область, г/о Подольск, п. Дубровицы, 142132 Россия

³Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия
им. К.А. Тимирязева, Москва, 127550 Россия

*e-mail: svbeketov@gmail.com

Поступила в редакцию 18.08.2020 г.

После доработки 11.11.2020 г.

Принята к публикации 17.11.2020 г.

С использованием микросателлитных маркеров исследовано генетическое разнообразие, родственные связи и дрейф генов трех пород и семи популяций шерстных (пуховых) коз Центральной и Средней Азии. Получены параметры аллельного и генетического разнообразия аборигенных популяций монгольских коз (гурван эгч, дархатская, бурах завхан, ульгий уулан, алтай уулан), двух популяций местных тувинских коз, советской и таджикской шерстных пород коз и оренбургской пуховой козы. С использованием метода главных компонент выявлены две основные группы коз, в одной из которых объединены преимущественно монгольские аборигенные популяции, а в другой – среднеазиатские породы коз. Популяции тувинской местной козы разделились между соответствующими группами. При этом монгольские козы характеризовались высоким внутривидовым разнообразием и достаточно низким уровнем генетических различий между популяциями. Полученные данные свидетельствуют о существовании корреляции генетических отношений между рассматриваемыми популяциями и породами пуховых коз и их географическим распределением.

Ключевые слова: пуховые козы, микросателлиты, генетическое разнообразие, филогения, биогеография.

DOI: 10.31857/S0016675821070031

Исследование генетической изменчивости автотонных популяций коз Евразии и пород, созданных на их основе, имеет большое значение для сохранения биоразнообразия и изучения эволюционно-филогенетических связей. В первую очередь это относится к породам и местным одомашненным популяциям шерстных коз Средней и Центральной Азии, которые изучены в гораздо меньшей степени по сравнению с пуховыми козами южной части Евразийского континента [1–3].

В последние годы для исследования генетической структуры популяций, групп или отдельных организмов практически повсеместно используют основанный на ПЦР метод ДНК-профилирования, или микросателлитного анализа. Согласно этой методике анализируют высокополиморфные короткие тандемно повторяющиеся (ди-, три- и тетра-нуклеотидные) последовательности ДНК, число которых может достигать нескольких тысяч. Поскольку индивидуумы имеют уникальное число повторяющихся участков ДНК, метод эффекти-

вен для установления различий и родственных связей [4].

Благодаря высокой степени полиморфизма, менделевскому типу наследования и равномерно распределению по всему геному [5] микросателлиты нашли применение для оценки уровней инбридинга, характеристики генетической структуры субпопуляций и популяций, демографической истории, определения эффективного размера популяций, величины и направления дрейфа генов между ними. Очень удобными STR-маркеры оказались для проведения филогеографических исследований, выявления биогеографической и генетической истории фауны больших регионов.

В связи с чем целью настоящей работы стало проведение сравнительного микросателлитного анализа пород и одомашненных популяций шерстных (пуховых) коз с учетом их географической принадлежности. Непосредственно в исследование были включены породы коз среднеазиатского

(таджикская шерстная, советская шерстная, оренбургская) и центрально-азиатского регионов (одомашненные популяции монгольских и тувинских пуховых коз).

Характеризуя изучаемые породы и популяции, следует отметить, что современный породный тип шерстных коз среднеазиатской группы сформировался сравнительно недавно. Например, процесс выведения знаменитой оренбургской пуховой козы включал несколько этапов. Первоначально, вплоть до начала XIX в., проводилась народная селекция среди одомашненных аборигенных пуховых коз южного склона Уральских гор. В 1937 г. для получения более высокой продуктивности по выходу пуха в Оренбургскую область завезли козлов Придонской породы [6], затем в течение 30 лет велись селекционные работы уже внутри сложившейся породы, путем отбора особей с наилучшими показателями по качеству пуха.

К созданию советской шерстной породы в Советском Союзе приступили в 1936 г. с приобретения в США 338 козлов и 400 ангорских коз, закупленных в штатах Техас и Нью-Мексико. Животные были размещены в хозяйствах Таджикистана, Узбекистана, Казахстана и Туркмении. Для повышения качества пуха местных популяций козлов ангорской породы скрещивали с грубошерстными матками аборигенных популяций. Итогом многолетней работы стало утверждение в 1962 г. породы коз — советская шерстная [7].

В 1981–1982 гг. в Республику Таджикистан в целях улучшения местных пуховых коз из Австралии было завезено 47 козлов ангорской породы, дополнительно использовали прилитие крови козлов советской шерстной породы из Казахстана и Киргизии. В результате в 2004 г. была выведена порода таджикская шерстная [8].

Если говорить о пуховом козоводстве Монголии, то здесь, несмотря на наличие двух самостоятельных пород — гоби гурван-сайхан и уулын-бор [9], в большей степени преобладают местные популяции шерстных коз.

В последние годы исследование генетического разнообразия одомашненных аборигенных коз Монголии стало предметом пристального внимания ученых разных стран мира. С использованием метода белковых маркеров крови и микросателлитного анализа была изучена генетическая структура нескольких популяций монгольских местных пуховых коз: баянделгер, улгий красная, эрчим черная, доргон, завхан буурал и сумбер [10–12]. Несмотря на это, генетическая изменчивость и межпопуляционные связи местных монгольских коз изучены еще в недостаточной степени. Так, отобранные нами аборигенные популяции коз — гурван эгч, дархатская, бурах завхан, улгий уулан и алтай уулан ранее не были исследованы. То же самое можно сказать и о местной тувинской козе.

В отличие от Монголии в соседней с ней Республике Тыва сложилась несколько иная ситуация. Здесь с середины 50-х гг. прошлого века начали проводить качественное улучшение местных тувинских коз путем завоза племенных козлов ангорской и советской шерстной пород. И сейчас имеется только небольшое поголовье тувинских грубошерстных аборигенных коз, которых разводят в чистоте в отдаленных районах республики [13].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований являлись образцы биоматериала (кровь) пяти популяций аборигенных пуховых коз Монголии ($n = 240$): гурван эгч (аймак Умнеговь, ранее Южно-Гобийский аймак) (MGL_SGOB, $n = 48$), дархатская (аймак Хувсгел) (MGL_HUV, $n = 48$), бурах завхан (аймак Завхан) (MGL_ZAH, $n = 48$), улгий уулан (аймак Увс) (MGL_UVC, $n = 48$), алтай уулан (аймак Ховд) (MGL_HOVD, $n = 48$) и двух популяций местных тувинских шерстных коз, разводимых в Республике Тыва ($n = 99$), включая животных СПК “Артыш” (Кызылский кожуун) (TUV_ART, $n = 48$) и СППК “Уургай” (Эрзинский кожуун) (TUV_UUR, $n = 51$).

Выделение ДНК из образцов крови осуществляли с использованием наборов ДНК—Экстран (ЗАО “Синтол”, Россия) согласно протоколу фирмы-изготовителя.

Количественную и качественную оценку полученных препаратов ДНК проводили с применением микроспектрофотометра Nano Drop 8000 (Thermo Fisher, США). Концентрацию геномной ДНК определяли на основании измерения степени поглощения при 260 нм, чистоту ДНК оценивали по соотношению степени поглощения при длинах волн 260 и 280 нм.

Исследование коз осуществляли по 14 STR-маркерам с использованием двух мультиплексных ПЦР-реакций, включающих восемь (INRA006, ILSTS087, INRA063, CSRD247, FCB20, ILSTS19, ILSTS011, MAF065) и шесть (INRA005, ILSTS008, SRCP003, SRCP008, SRCP023, MCM527) локусов микросателлитов. Для сравнительного анализа использовали генотипы оренбургской (ООО ГКХ “Губерлинское”, Оренбургская обл.) (ORB, $n = 30$), советской шерстной (МУП “Ангорка”, Республика Тыва) (SOV_W, $n = 33$), таджикской шерстной пород коз ($n = 34$) (ОПХ “Табошар”, Республика Таджикистан) (TAD_W, $n = 33$) по восьми локусам микросателлитов (INRA006, LSTS087, CSRD247, OARFCB20, ILSTS011, MAF065, ILSTS008, MCM527), предоставленные объектом инфраструктуры ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста.

Капиллярный электрофорез проводили на генетическом анализаторе ABI 3130xl (Applied Biosystems, США) с последующим определением

Таблица 1. Параметры аллельного разнообразия монгольской и тувинской популяций коз

Популяция	n	N_a	N_E	$N_A \geq 5\%$	A_R
MGL_SGOB	48	8.750 ± 0.750	4.983 ± 0.599	5.750 ± 0.491	8.117 ± 0.656
MGL_HUV	48	7.500 ± 0.756	3.541 ± 0.548	4.750 ± 0.750	6.972 ± 0.828
MGL_ZAH	48	8.500 ± 0.845	5.102 ± 0.597	6.125 ± 0.639	8.194 ± 0.770
MGL_UVC	48	8.500 ± 0.627	4.810 ± 0.611	5.750 ± 0.453	8.013 ± 0.560
MGL_HOVD	48	7.625 ± 0.498	4.263 ± 0.479	5.000 ± 0.463	7.077 ± 0.456
TUV_ART	48	7.875 ± 0.639	3.983 ± 0.365	4.875 ± 0.398	7.104 ± 0.499
TUV_UUR	49	8.250 ± 0.921	4.699 ± 0.533	5.625 ± 0.532	7.824 ± 0.771

Примечание. Для табл. 1, 4: N_a – среднее число аллелей на локус; N_E – число эффективных аллелей на локус; $N_A \geq 5\%$ – число информативных аллелей с частотой более 5%; A_R – аллельное разнообразие.

длин аллелей микросателлитов в программном обеспечении GeneMapper v. 4.0 (Applied Biosystems).

Для оценки структуры изучаемых пород и аборигенных популяций коз использовали следующие показатели: наблюдаемая (H_O) и несмещенная ожидаемая ($H_{E(u)}$) гетерозиготность [14], среднее число аллелей на локус (N_a), число эффективных аллелей на локус (N_E), число информативных аллелей с частотой более 5% ($N_A \geq 5\%$), аллельное разнообразие (A_R) [15], коэффициент инбридинга (F_{IS}).

Степень генетической дифференциации исследуемых пород и популяций коз оценивали на основании попарных генетических различий (индекс фиксации F_{ST}) [16], попарных генетических дистанций по Jost's D [17]. Филогенетические отношения устанавливали путем определения построения Neighbor-net дендрограмм [18].

Результаты оценки генетической структуры популяций были получены с помощью адмикс-модели. Анализ базы данных STR-вариабельности монгольских и тувинских популяций коз проводили для k от 1 до 7 при длине burn-in периода – 100000, модель Марковских цепей Монте-Карло (MCMC) – 1000000 повторов. Аналогичный анализ шерстных пород коз с использованием баз данных геномной вариабельности ОНИС БиотехЖ выполняли для k от 1 до 12 при условии, что длина burn-in периода – 50000 и модель Марковских цепей Монте-Карло (MCMC) – 500000 повторов. Для каждого значения k выполняли 10 итераций.

Для формирования исходных файлов и проведения анализа использовали R версию 3.3.2 [19], программное обеспечение GenAlEx 6.5 [20] и R пакет “diveRsity”, STRUCTURE 2.3.4 [21] с последующей визуализацией в “pophelper” [22]. Анализ главных компонент (Principal Component Analysis, PCA) проводили с помощью R пакета adegenet [23] с визуализацией в ggplot2 [24].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты оценки аллельного разнообразия в изучаемых популяциях коз представлены в табл. 1.

Можно видеть, что значение показателя A_R в локусах микросателлитов варьировало от 6.972 ± 0.828 в популяции MGL_HUV до 8.194 ± 0.770 – в MGL_ZAH. При этом минимальное число эффективных аллелей было выявлено в популяциях MGL_HUV и TUV_ART – 3.541 ± 0.548 и 3.983 ± 0.365 соответственно. Число информативных аллелей в исследованных группах коз было относительно высоким и варьировало от 4.750 ± 0.750 в монгольской популяции коз MGL_HUV до 6.125 ± 0.639 – в MGL_ZAH. В целом исследованные географические группы коз монгольской и тувинской популяций характеризовались сопоставимым уровнем генетического разнообразия. Выявленные различия между группами были несущественны и носили характер тенденций (табл. 1).

Анализ значений коэффициента инбридинга F_{IS} показывает наличие дефицита гетерозигот в двух популяциях монгольских коз: MGL_UVC – 0.076 [0.028; 0.124] и MGL_HOVD – 0.088 [0.022; 0.154] (табл. 2).

Генетические дистанции между исследованными группами коз монгольских и тувинских популяций, рассчитанные на основании F_{ST} и Jost's D , обобщены в табл. 3.

Генетические различия между монгольскими и тувинскими группами коз были выше ($F_{ST} = 0.025–0.106$, Jost's $D = 0.049–0.252$), чем между популяциями коз внутри монгольской ($F_{ST} = 0.014–0.066$, Jost's $D = 0.024–0.146$) и тувинской групп животных ($F_{ST} = 0.054$, Jost's $D = 0.138$).

Самостоятельный интерес представляет сравнение STR-вариабельности объединенных групп монгольских и тувинских популяций (табл. 4).

Как показано в табл. 5, в группе монгольских популяций выявлен наиболее высокий уровень генетического разнообразия в сравнении с объединенной группой тувинских популяций и по-

Таблица 2. Параметры генетического разнообразия монгольской и тувинской популяций коз

Популяция	<i>n</i>	H_O	$H_{E(u)}$	F_{IS} (95%CI)
MGL_SGOB	48	0.740 ± 0.052	0.779 ± 0.036	0.052 (–0.033; 0.137)
MGL_HUV	48	0.690 ± 0.057	0.673 ± 0.051	–0.030 (–0.129; 0.069)
MGL_ZAH	48	0.737 ± 0.039	0.784 ± 0.037	0.050 (–0.055; 0.155)
MGL_UVC	48	0.714 ± 0.047	0.769 ± 0.038	0.076 (0.028; 0.124)
MGL_HOVD	48	0.685 ± 0.041	0.750 ± 0.031	0.088 (0.022; 0.154)
TUV_ART	48	0.719 ± 0.044	0.734 ± 0.038	0.023 (–0.025; 0.071)
TUV_UUR	49	0.735 ± 0.054	0.751 ± 0.059	0.009 (–0.060; 0.078)

Примечание. Для табл. 2, 5: H_O – наблюдаемая гетерозиготность; $H_{E(u)}$ – несмещенная ожидаемая гетерозиготность; F_{IS} – коэффициент инбридинга; CI – доверительный интервал.

Таблица 3. Генетические дистанции между исследуемыми популяциями коз

Популяция	MGL_SGOB	MGL_HUV	MGL_ZAH	MGL_UVC	MGL_HOVD	TUV_ART	TUV_UUR
MGL_SGOB	*	0.055	0.014	0.015	0.025	0.051	0.030
MGL_HUV	0.115	*	0.050	0.066	0.060	0.106	0.064
MGL_ZAH	0.024	0.106	*	0.017	0.026	0.056	0.029
MGL_UVC	0.036	0.146	0.040	*	0.017	0.050	0.025
MGL_HOVD	0.045	0.106	0.058	0.032	*	0.055	0.039
TUV_ART	0.134	0.252	0.142	0.130	0.121	*	0.054
TUV_UUR	0.073	0.145	0.088	0.049	0.100	0.138	*

Примечание. Парные генетические дистанции по значениям F_{ST} показаны над диагональю, по значениям Jost’s D – под диагональю.

Таблица 4. Параметры аллельного разнообразия исследуемых групп популяций и пород коз

Группа популяций/порода	<i>n</i>	N_a	N_E	$N_A \geq 5\%$	A_R
MGL	240	10.750 ± 0.773	5.335 ± 0.827	5.375 ± 0.460	8.314 ± 0.723
TUV	97	9.250 ± 0.648	4.890 ± 0.516	5.500 ± 0.463	7.961 ± 0.586
ORB	30	7.500 ± 0.866	4.250 ± 0.445	5.000 ± 0.535	7.500 ± 0.866
TAD_W	33	7.875 ± 0.934	4.139 ± 0.422	4.625 ± 0.324	7.776 ± 0.911
SOV_W	33	8.375 ± 0.885	4.524 ± 0.455	4.875 ± 0.515	8.217 ± 0.843

родами среднеазиатских шерстных коз, в то время как тувинская группа местных шерстных коз занимала промежуточное положение по данному показателю. Также группы монгольских и тувинских популяций характеризовались наибольшими значениями числа эффективных аллелей.

Причем как в монгольской, так и в тувинской группе был выявлен дефицит гетерозигот, однако в абсолютном значении данные популяции характеризовались меньшим уровнем этого показателя по сравнению с оренбургской породой: 7.4 и 4.4% соответственно, против 12.7%.

Как видно из данных, представленных в табл. 6, в группе исследованных монгольских популяций коз наиболее генетически удалена от других популяция MGL_HUV. На дендрограммах это отражено в формировании длинной отдельной ветви (рис. 1, 2).

В целом же популяции аборигенных монгольских коз характеризовались, прежде всего, сродством между собой. Следует отметить также филогенетическую связь тувинской популяции коз (Эрзинский кожуун) TUV_UUR с монгольской аборигенной популяцией ульгий уулан (аймак Увс) MGL_UVC, что отчасти объясняется географической близостью зон их разведения.

Таблица 5. Параметры генетического разнообразия исследуемых групп популяций и пород коз

Группа популяций/порода	<i>n</i>	H_O	$H_{E(u)}$	F_{IS} (95%CI)
MGL	240	0.713 ± 0.037	0.773 ± 0.041	0.074 (0.026; 0.122)
TUV	97	0.727 ± 0.045	0.764 ± 0.051	0.044 (0.013; 0.075)
ORB	30	0.662 ± 0.063	0.751 ± 0.038	0.127 (0.02; 0.234)
TAD_W	33	0.769 ± 0.048	0.75 ± 0.029	-0.023 (-0.112; 0.066)
SOV_W	33	0.739 ± 0.059	0.771 ± 0.029	0.050 (-0.061; 0.161)

Таблица 6. Генетические дистанции между исследуемыми популяциями и породами коз

Популяция/ порода	ORB	TAD_W	SOV_W	MGL_SGOB	MGL_HUV	MGL_ZAH	MGL_UVC	MGL_HOVD	TUV_ART	TUV_UUR
ORB	*	0.051	0.038	0.020	0.091	0.045	0.045	0.041	0.068	0.047
TAD_W	0.092	*	0.027	0.051	0.094	0.048	0.062	0.045	0.050	0.054
SOV_W	0.094	0.041	*	0.033	0.086	0.028	0.038	0.04	0.043	0.036
MGL_SGOB	0.066	0.110	0.061	*	0.055	0.014	0.015	0.025	0.051	0.030
MGL_HUV	0.212	0.202	0.180	0.115	*	0.050	0.066	0.060	0.106	0.064
MGL_ZAH	0.110	0.099	0.053	0.024	0.106	*	0.017	0.026	0.056	0.029
MGL_UVC	0.113	0.125	0.086	0.036	0.146	0.04	*	0.017	0.050	0.025
MGL_HOVD	0.099	0.082	0.096	0.045	0.106	0.058	0.032	*	0.055	0.039
TUV_ART	0.149	0.115	0.121	0.134	0.252	0.142	0.13	0.121	*	0.054
TUV_UUR	0.093	0.117	0.062	0.073	0.145	0.088	0.049	0.100	0.138	*

Примечание. Попарные генетические дистанции по значениям F_{ST} показаны над диагональю, по значениям Jost's D – под диагональю.

При этом популяция местных тувинских коз (Кызылского кожуна) TUV_ART проявляет большее генетическое родство к таджикской и советской шерстным породам. На дендрограммах это проявляется в локализации данной популяции в общем кластере с этими среднеазиатскими козами (рис. 1, 2). Следует указать также на близость группы MGL_SGOB монгольских коз с оренбургской породой: генетические дистанции между MGL_SGOB и оренбургской породой были меньше, чем между MGL_SGOB и группами коз тувинской популяции (рис. 1).

Результаты анализа главных компонент согласуются с результатами расчета генетических дистанций (рис. 3).

Анализ популяционно-генетической структуры изученных популяций и пород коз (рис. 4) при $k = 2$ показывает разделение пород на две группы, одна из которых включает все популяции местных монгольских коз, тувинскую популяцию TUV_UUR и оренбургскую породу, а вторая – тувин-

скую популяцию TUV_ART, советскую шерстную и таджикскую шерстные породы, при этом наблюдается четкая адмиксия между группами. Наименьшая адмиксия отмечена для популяций пуховых коз TUV_ART и MGL_HUV.

При $k = 3$ популяции MGL_HUV, TUV_ART и оренбургская порода формируют собственные кластеры с наименьшей степенью адмиксии других предковых компонентов, которые сохраняются при $k = 4$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что к изменчивости генетической структуры популяций приводят такие процессы как географическая изоляция, миграция и адмиксия, в ходе которых индивиды приобретают большее или меньшее родство или различие, однако сделать объективные выводы о природе и времени проявления таких изменений чаще всего достаточно сложно.

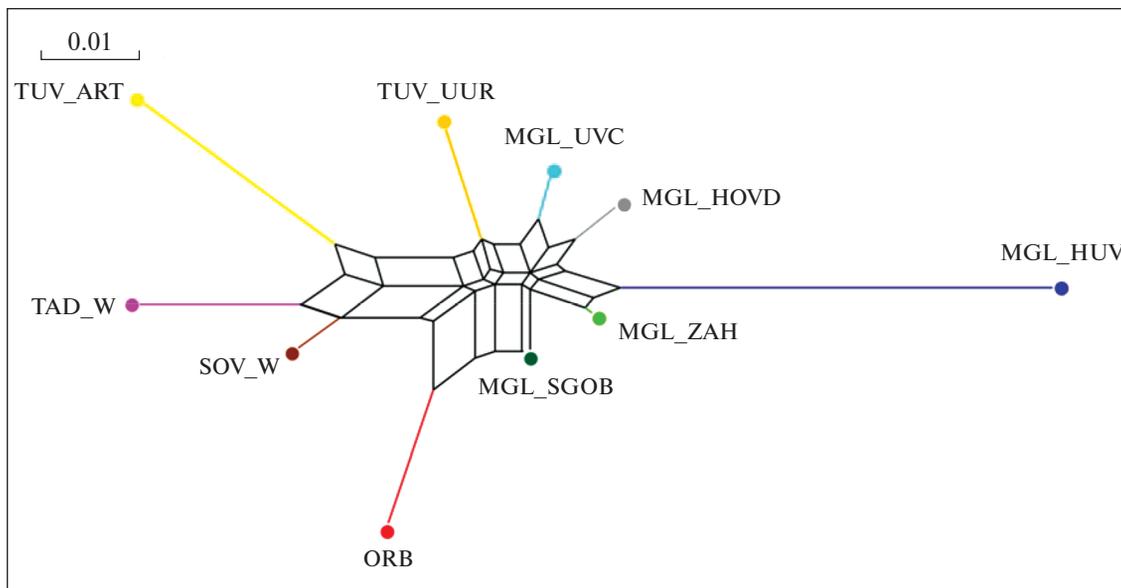


Рис. 1. Neighbor-net дендрограмма взаимоотношений исследуемых популяций и пород коз, построенная на основе матрицы попарных генетических дистанций F_{ST} .

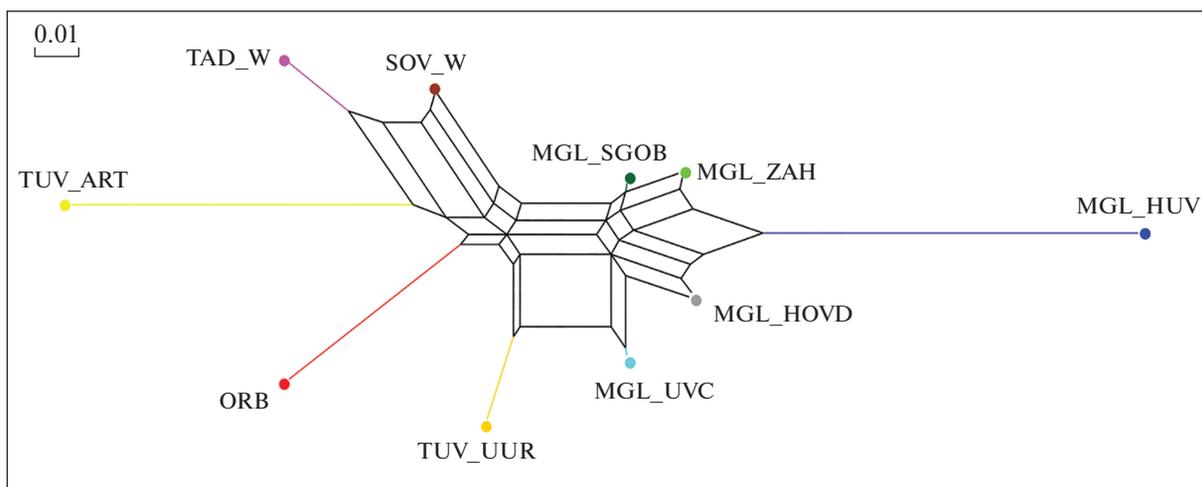


Рис. 2. Neighbor-net дендрограмма взаимоотношений исследуемых популяций и пород коз, построенная на основе матрицы попарных генетических дистанций Jost's D .

С учетом того, что создание современных шерстных пород Средней Азии и попытки улучшения аборигенных популяций пуховых коз Центральной Азии проходили в новейшее время, можно относительно объективно отразить причины, повлекшие существенные изменения в их генетической структуре.

Важно отметить, что до сих пор определяющую роль в современном животноводстве Монголии продолжает играть нomaдизм — традиционное кочевое и полукочевое животноводство, остающееся главным видом хозяйственной деятельности сельского населения [25]. Причем неконтролиру-

емый трансграничный перегон скота из Монголии в Туву и обратно был осуществим вплоть до введения ограничений в 1949 г. [12]. Возможно, этим обстоятельством объясняется филогенетическое родство популяции тувинской козы СППК “Уургай” (Эрзинский кожуун) с козами пограничного монгольского аймака Увс.

Как уже отмечалось выше, по своему породному составу козоводство в Монголии представлено многочисленными отродьями азиатской пуховой козы и двумя породами: гоби гурван-сайхан (Южно-Гобийский аймак) и уулын-бор (Баян-Улэгейский и Кобдоский аймаки), полученными

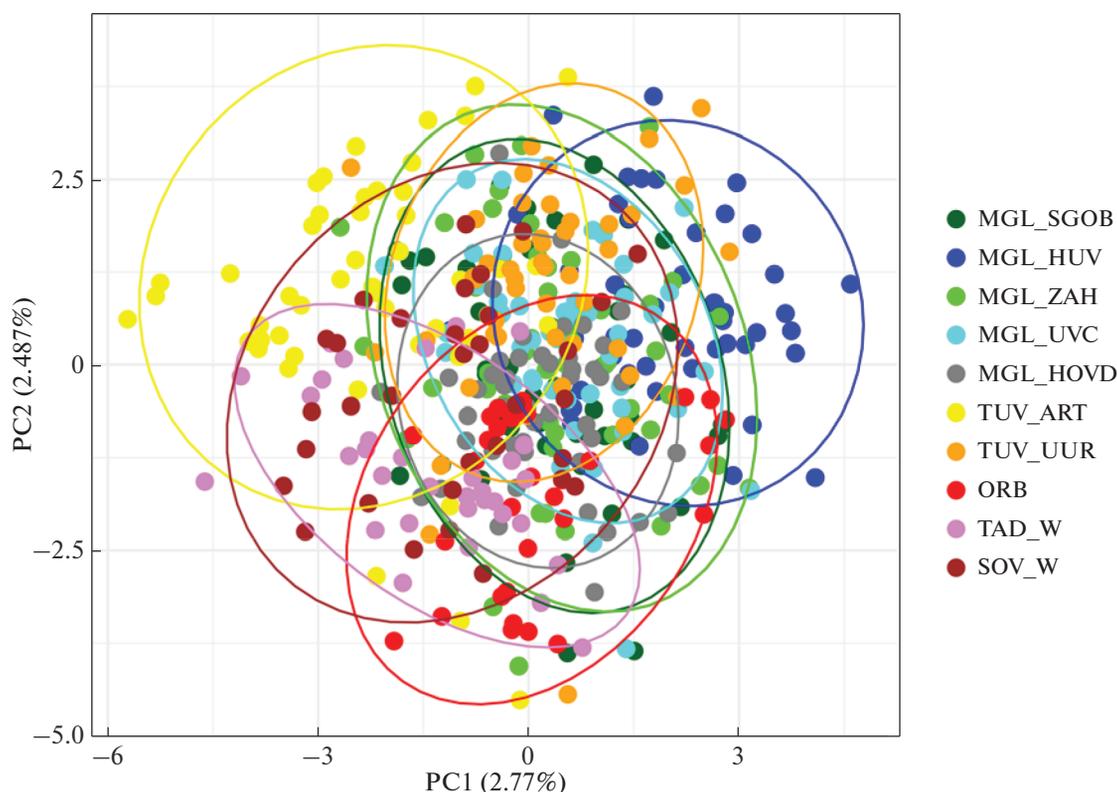


Рис. 3. Проекция особей исследуемых пород и популяций коз на плоскости двух координат по данным PCA-анализа.

путем скрещивания аборигенных коз с козлами придонской и горно-алтайской пород [9].

Однако, несмотря на повышение продуктивности, качество пуха у породных животных стало ниже, чем у исходных местных монгольских коз [12]. В связи с чем для улучшения общей популяции коз учеными Монголии была разработана собственная программа отбора аборигенных животных по наиболее важным хозяйственно ценным признакам.

Местные популяции монгольских пуховых коз отличаются крепкой конституцией и хорошей приспособленностью к разведению в условиях круглогодичного пастбищного содержания. При этом даже в пределах одной популяции животные часто отличаются большим многообразием фенотипической изменчивости в окраске волосяного покрова [25].

Однако несмотря на повышенный интерес к монгольским популяциям коз их генетическая структура и родственные связи изучены еще в недостаточной степени, и имеются лишь единичные работы, посвященные этому вопросу. В частности, оценку генетической близости между пятью аборигенными популяциями коз Монголии определяли по 12 полиморфным белковым маркерам крови: трансферрину, амилазе, щелочной фосфатазе, преальбумину-3, эстеразе D, α -глоби-

ну, β -глобину, пептидазе-B, тетразолиевой оксидазе, эстеразе-1, эстеразе-2 и каталазе. По результатам анализа было установлено, что, несмотря на морфометрические различия, выявляемые у местных коз в разных районах Монголии, генетические межпопуляционные дистанции между ними оказались очень близкими ($D = 0.0002-0.0038$) [10].

Похожий результат был получен в работе Такахаша с соавт. [12] с использованием 10 микросателлитных маркеров. В частности, было установлено, что несмотря на высокое генетическое разнообразие в популяциях (оценка по ожидаемой гетерозиготности 0.719–0.746) дифференциация между ними составила всего лишь 1.7% от общей генетической изменчивости, что указывает на относительную межпопуляционную однородность и наличие интенсивного генного потока между ними [12].

Известно, что межпопуляционные генетические связи зависят, в первую очередь, от величины эффективного потока генов между субпопуляциями или подгруппами. И если интенсивность генного потока между группами высока, он направлен на гомогенизацию генетической изменчивости между ними [26].

Это подтверждается и данными, полученными в настоящей работе, согласно которым несме-

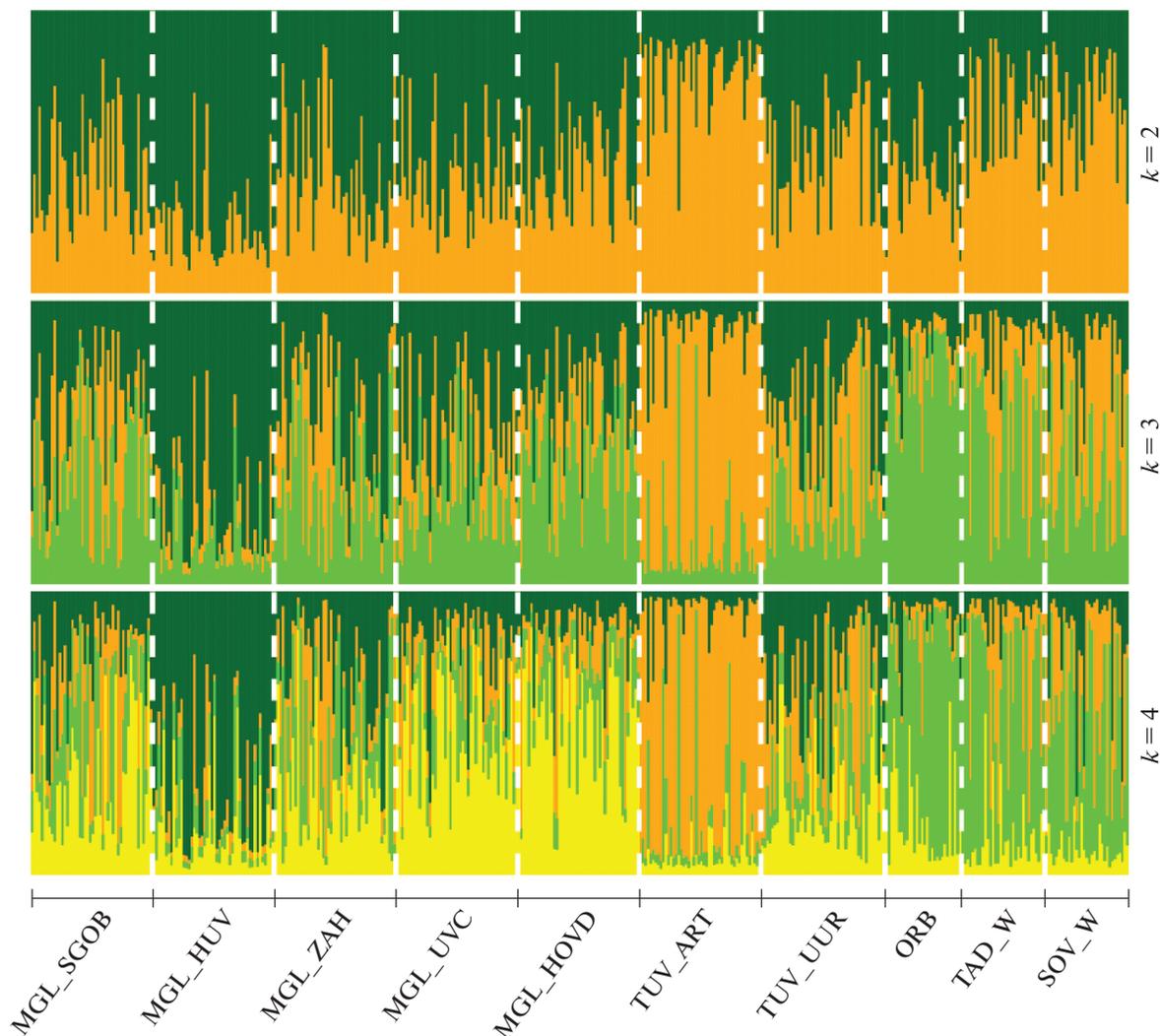


Рис. 4. Популяционно-генетическая структура пород и популяций коз.

шенная ожидаемая гетерозиготность составляет у рассматриваемых популяций монгольских коз (0.673–0.784), а дифференциация между ними составила 3.5%.

То есть фактически монгольские популяции коз до сих пор не дифференцированы до уровня пород и имеют генетическую структуру, свойственную для неполностью одомашненных животных, что является следствием как ведения традиционного животноводства, так и очень короткой во времени истории селекции [12].

Это хорошо заметно при сравнении монгольских популяций с местными тувинскими козами, которые подверглись неоднородной метисизации, соответственно ожидаемая гетерозиготность исследованных нами тувинских популяций составила (0.734–0.751), а межпопуляционная дифференциация – 9.6%.

Если говорить в целом, то у рассматриваемых в настоящей работе средне- и центрально-азиатских пород и аборигенных популяций пуховых коз уровень гетерозиготности существенно не различался.

При этом с помощью метода главных компонент были выявлены две основные группы коз, в одной из которых были объединены преимущественно монгольские местные популяции коз, а во второй – среднеазиатские породы. Популяции тувинской местной козы разделились между соответствующими группами.

Во многом объединяющим фактором, позволившим сформировать относительно целостную группу среднеазиатских коз, является то, что в создании отдельных ее пород принимали участие ангорские козы либо напрямую, как в случае с советской и таджикской шерстными породами, либо опосредованно, как при выведении оренбургской породы (скрещивание с козами придонской по-

роды коз). Отчасти этим же фактором можно объяснить и промежуточное положение тувинских популяций коз (прилитие крови ангорской и советской шерстной пород).

Например, ранее в работе монгольских и австралийских исследователей в ходе микросателлитного анализа по сравнению генетического сходства ангорской и кашемировой коз с монгольскими шерстными козами наименьшее генетическое расстояние отмечали у кашемировой козы – 0.096, а наибольшее – у ангорской породы – 0.276 [11]. Причем при сравнении попарных генетических дистанций ближе всего к ангорской козе была монгольская порода коз гоби гурван-сайхан (0.192), которая, в свою очередь, была создана с участием придонской породы [12].

В нашем случае при сравнении попарных генетических дистанций по F_{ST} оренбургская порода коз ORB имеет больше сходств с MGL_SGOB (0.02), чем с советской шерстной породой SOV_W (0.03) (табл. 6), что предположительно свидетельствует о ее изначальном родстве с центрально-азиатской группой коз и прежде всего с монгольскими популяциями. В то время как тувинская популяция коз СПК “Артыш” TUV_AR оказалась генетически ближе советской шерстной породе SOV_W (0.043), а также, наряду с монгольской популяцией коз ульгий уулан, MGL_UVC (0.05) – таджикской шерстной козе TAD_W (0.05), что является результатом сравнительно недавнего прилития к тувинским козам крови советской шерстной и ангорской коз. Причем близость к монгольским популяциям коз у тувинской козы СПК “Артыш” TUV_AR оказалась больше (0.051–0.106), чем к тувинской козе СПК “Уургай” TUV_UUR (0.138).

Таким образом, в целом можно говорить о существовании корреляции генетических отношений между рассматриваемыми популяциями и породами и их географическим распределением, а полученные в исследовании результаты по генетической структуре центрально-азиатских и среднеазиатских шерстных коз и их взаимоотношениям могут иметь не только теоретическое, но и практическое значение для решения вопросов происхождения, установления родства, распространения, а также сохранения генофондов пород и популяций коз.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РНФ в рамках проектов № 19-76-20061 и 19-76-20006.

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Mahmoudi B., Bayat M., Sadeghi R. et al.* Genetic diversity among three goat populations assessed by microsatellite DNA markers in Iran // *Gbl. Vet.* 2010. V. 4. № 2. P. 118–124.
2. *Nomura K., Ishii K., Dadi H. et al.* Microsatellite DNA markers indicate three genetic lineages in East Asian indigenous goat populations // *Anim. Genet.* 2012. V. 43. P. 760–767.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2012.02334.x>
3. *Elzarei M.F., Mousa E.F.* Molecular and morphological characteristics of aradi goats with prediction equation of growth pattern // *Intl. J. Biol.* 2017. V. 9. № 2. P. 29–38.
<https://doi.org/10.5539/ijb.v9n2p29>
4. *Wagner R.P.* Understanding inheritance: An introduction to classical and molecular genetics // *Los Alamos Sci. LANL.* 1992. № 20. P. 3–67.
5. *Dakin E.E., Avise J.C.* Microsatellite null alleles in parentage analysis // *Heredity.* 2004. V. 93. P. 504–509.
<https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800545>
6. *Зеленский Г.Г., Мишаев С.С.* Оренбургская пуховая коза. Чкалов: Чкаловское кн. изд-во, 1949. 80 с.
7. *Харзинова В.Р., Петров С.Н., Доцев А.В. и др.* Популяционно-генетическая характеристика некоторых пород коз на основе анализа микросателлитов // *Овцы, козы, шерстяное дело.* 2019. № 3. С. 7–12.
8. *Косимов М.А., Косимов Ф.Ф.* Таджикская шерстная порода коз // *Зоотехния.* 2015. № 3. С. 5–7.
9. *Альков Г.В.* Пуховое козоводство в Алтайском горном регионе // *Сб. науч. тр. Всерос. научно-исследовательского института овцеводства и козоводства.* Ставрополь. 2007. Т. 3. С. 142–146.
10. *Nyamsamba D., Nomura Nozawa K., Yokohama M. et al.* Genetic relationship among Mongolian native goat populations estimated by blood protein polymorphism // *Small Ruminant Res.* 2003. V. 47. P. 3171–3181.
11. *Bolormaa S., Ruvinsky A., Walkden-Brown S., van der Werf J.* Genetic relationships among Australian and Mongolian fleece-bearing goats // *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 2008. V. 21. № 11. P. 1535–1543.
<https://doi.org/10.5713/ajas.2008.70635>
12. *Takahashi H., Nyamsamba D., Mandakh B. et al.* Genetic structure of Mongolian goat populations using microsatellite loci analysis // *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 2008. V. 21. № 7. P. 947–953.
<https://doi.org/10.5713/ajas.2008.70285>
13. *Самбу-Хоо Ч.С.* Продуктивные и биологические особенности коз разного происхождения в условиях Республики Тыва: Дис. ... канд. с.-х. наук: ВИЖ, 2016. 145 с.
14. *Nei M.* Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals // *Genetics.* 1978. V. 89. № 3. P. 583–590.
15. *Kalinowski S.T.* Counting alleles with rarefaction: Private alleles and hierarchical sampling designs // *Conserv. Genet.* 2004. № 5. P. 539–543.
<https://doi.org/10.1023/B:COGE.0000041021.91777.1a>
16. *Weir B.S., Cockerham C. C.* Estimating F -statistics for the analysis of population structure // *Evolution.* 1984. V. 38. № 6. P. 1358–1370.
<https://doi.org/10.2307/2408641>

17. *Jost L.* GST and its relatives do not measure differentiation // *Mol. Ecol.* 2008. № 17. P. 4015–4026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03887.x>
18. *Huson D.H., Bryant D.* Application of phylogenetic networks in evolutionary studies // *Mol. Biol. Evol.* 2006. V. 23. № 2. P. 254–267. <https://doi.org/10.1093/molbev/msj030>
19. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna. 2018. <https://www.R-project.org>.
20. *Peakall R., Smouse P.E.* GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update // *Bioinformatics.* 2012. V. 28. № 19. P. 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
21. *Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P.* Inference of population structure using multilocus genotype data // *Genetics.* 2000. V. 155. № 2. P. 945–959.
22. *Keenan K., McGinnity P., Cross T.F. et al.* DiveRsity: An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors // *Methods Ecol. Evol.* 2013. № 4. P. 782–788. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12067>
23. *Jombart T.* ADEGENET: A R package for the multivariate analysis of genetic markers // *Bioinformatics.* 2008. V. 24. № 11. P. 1403–1405. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129>
24. *Wickham H.* Ggplot2: Elegant graphics for Data Analysis. Springer-Verlag, 2009. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4>
25. *Гомбожапов А.* К вопросу о проблеме номадизма в современной Монголии // *Власть.* 2009. № 10. С. 129–132.
26. *Хедрик Ф.* Генетика популяций. М.: Техносфера, 2003. 592 с.

Genetic Diversity and Phylogeny of Fleece-Bearing Goats of Central and Middle Asia

S. V. Beketov^{a, *}, A. K. Piskunov^a, V. N. Voronkova^a, S. N. Petrov^b, V. R. Kharzinova^b, A. V. Dotsev^b, N. A. Zinovieva^b, M. I. Selionova^c, and Yu. A. Stolpovsky^a

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

^b*Federal Research Center for Livestock – VIZh named after academician L.K. Ernst, Dubrovitsy 60, Podolsk Municipal District, Moscow region, 142132 Russia*

^c*Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, 127550 Russia*

*e-mail: svbeketov@gmail.com

Using microsatellite markers, genetic diversity, native suites, and gene drift of 3 breeds and 7 populations of wool (down) goats of Central and Middle Asia were studied. The parameters of allelic and genetic diversity of indigenous populations of Mongolian goats were obtained: Gurvan Egch, Darkhat, Burakh Zakhkhan, Ulgiy Uulan, Altai Uulan, two populations of local Tyva goats, Soviet and Tajik wool goats and Orenburg fleece-bearing goat. It is based on all the main groups in which the Mongolian native populations are represented, as well as the second Middle Asian breeds. At the same time, Mongolian goats are distinguished by high intrapopulation diversity and a fairly low level of genetic differences between populations. In general, we can talk about the existence of a correlation of genetic relations between populations and breeds of fleece-bearing goats and their geographical distribution.

Keywords: fleece-bearing goats, microsatellites, genetic diversity, phylogeny, biogeography.

ИЗМЕНЧИВОСТЬ КОНТРОЛЬНОГО РЕГИОНА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК И ФИЛОГЕОГРАФИЯ БОЛЬШОГО СУСЛИКА (*Spermophilus major*, Sciuridae, Rodentia)*

© 2021 г. О. В. Брандлер^{1, *}, А. Р. Тухбатуллин¹, С. Ю. Капустина¹,
Д. М. Щепетов^{1, 2}, С. В. Титов³, О. А. Ермаков³

¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

²Московский государственный университет, Москва, 119234 Россия

³Пензенский государственный университет, Пенза, 440026 Россия

*e-mail: rusmarmot@yandex.ru

Поступила в редакцию 22.08.2020 г.

После доработки 20.12.2020 г.

Принята к публикации 18.01.2021 г.

Большой суслик (*Spermophilus major*) – широкоареальный вид, имеющий протяженный ареал, частично разделенный Уральским хребтом на восточную и западную части. Ранее была обнаружена гибридизация большого суслика в зонах контакта с пятью другими видами *Spermophilus*, сопровождающаяся массовой интрогрессией их митохондриальных геномов. В настоящей работе впервые проведен сравнительный анализ изменчивости контрольного региона мтДНК *S. major* на всем ареале вида, без учета влияния чужеродных гаплотипов. Показано, что видоспецифичные гаплотипы *S. major* распространены во всех частях его современного ареала и характеризуются низким уровнем внутривидовой изменчивости. Филогеографическая структура большого суслика слабо дифференцирована и не образует ярко выраженных географически локализованных филологических линий. В целом ареал вида представляет собой единое генетическое пространство, слабо разделенное Уральским горным массивом. Пространственное распределение гаплотипов свидетельствует о наличии на Среднем Урале обмена между западной и восточной частями ареала. Показатели генетического разнообразия свидетельствуют в пользу экспансивного характера роста численности популяции, возможного расширения ареала из восточной части в западном направлении и кратковременных контактов предуральских и зауральских северных популяций. Результаты анализа генетической изменчивости *S. major* не поддерживают принятую подвидовую систему.

Ключевые слова: большой, или рыжеватый суслик; *Spermophilus major*; митохондриальный геном; контрольный регион мтДНК; филогеография.

DOI: 10.31857/S0016675821070055

Большой, или рыжеватый суслик (*Spermophilus major* Pallas, 1778) является типичным представителем наземных беличьих Евразии, населяющих открытые степные биотопы. Обширный ареал вида протянулся от правобережья Волги до Тоболо-Ишимского междуречья, огибая с юга Уральский хребет [1, 2]. Ранее было установлено, что большой суслик вступает в гибридизацию с малым (*S. pygmaeus*), крапчатым (*S. suslicus*), желтым, или песчанником (*S. fulvus*) на западной границе ареала и краснощеким (*S. erythrogegnys*) и короткохвостым

(*S. brevicauda*) сусликами на востоке [3–7]. Известный с середины прошлого века [8] феномен гибридизации большого суслика в зонах симпатрии или вторичных контактов с другими видами сусликов, по-видимому, представляет собой пример обширной интеграции чужеродных генов в видовой геном. Подобные случаи являются более редкими, чем спорадическая гибридизация или образование стабильной узкой гибридной зоны при вторичных контактах близких видов млекопитающих [9], и поэтому особенно интересны. Благодаря этому большой суслик в течение двух последних десятилетий находится под пристальным вниманием специалистов, изучающих влияние межвидовой гибридизации на генетическую изменчивость контактирующих видов и механизмы

* Авторы О.В. Брандлер и А.Р. Тухбатуллин внесли равный вклад в работу и подготовку рукописи. Все авторы участвовали в обсуждении материалов исследования и подготовке рукописи.

Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0016675821070055 для авторизованных пользователей.

поддержания видовой специфичности их геномов [3, 7, 10, 11].

Молекулярно-генетические исследования обнаружили в популяциях *S. major* обширную интрогрессию митохондриальной ДНК контактирующих с ним видов. Было показано, что в пределах своего ареала на расстоянии 100 км от Волги 47% особей *S. major* имеют чужеродный митотип малого или желтого сусликов [5]. На основании данных секвенирования цитохрома *b* (*cytb*) экземпляров из области перекрывания ареалов *S. major* и *S. brevicauda* в междуречье Тобола и Ишима высказано предположение о полном замещении митохондриального гаплотипа большого суслика гаплотипом короткохвостого и поставлен вопрос о существовании у *S. major* собственного нативного митотипа [7]. Небольшая генетическая дистанция (0.5%) между *S. brevicauda* и *S. major* обнаружена и по данным анализа фрагмента первой субъединицы гена цитохромоксидазы (*COI*) мтДНК [12]. По мнению авторов наиболее правдоподобным объяснением этой закономерности является полная замена нативной мтДНК *S. major* в ходе древней гибридизации с *S. brevicauda* с последующим расхождением [12].

Несмотря на случаи гибридизации с другими видами сусликов в зонах симпатрии и широкую интрогрессию чужеродной мтДНК, обнаруженную далеко за пределами зон контакта ареалов, большой суслик сохраняет свое видовое своеобразие, проявляющееся на морфологическом, экологическом и этологическом уровнях [13]. У него были описаны видоспецифические особенности кариотипа [14] и вокализации [15]. Однако слабая дифференциация в группе близких видов “major”, включающей *S. major*, *S. brevicauda*, *S. erythrognys* и *S. pallidicauda*, выраженная в недостаточно высоком уровне различий этих форм по морфологическим, генетическим, биоакустическим признакам (см. обзор [16]), нашла отражение в том, что видовая самостоятельность *S. major* признавалась не всеми авторами, которые объединяли его с *S. brevicauda* и/или *S. erythrognys* или с некоторыми из их подвидов [13, 17, 18].

Анализ внутривидовой изменчивости маркеров митохондриального генома с использованием выборок, охватывающих большую часть ареала, является необходимым условием решения как филогеографических, так и филогенетических задач. Большинство исследований *S. major* сосредоточено на краевых популяциях, расположенных в зонах контакта с другими видами, в то время как генетическая структура и изменчивость в центральной части его обширного ареала остается до сих пор малоизученной. Однако задача делимитации собственного митохондриального генома большого суслика, вне зависимости от его происхождения, с геномами гибридизирующих с ним

видов требует представления о его генетической изменчивости на всей территории обитания.

Обширный ареал *S. major* разделяется в меридиональном направлении на две почти равные части Уральскими горами (рис. 1). Влияние этого естественного эколого-географического барьера на внутривидовую изменчивость большого суслика практически не изучено.

В связи с вышеизложенными целями нашей работы стали: 1) оценка внутривидового полиморфизма контрольного региона мтДНК большого суслика из всех частей ареала без учета влияния чужеродных интрогрессивных гаплотипов; 2) описание филогеографической структуры *S. major* и исследование влияния на нее эколого-географических барьеров, в частности Уральских гор.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом послужили образцы тканей (когтевые фаланги пальцев, печень, почки, мышцы) сусликов, хранящиеся в “Объединенной коллекции тканей диких животных для фундаментальных, прикладных и природоохранных исследований” Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (ИБР РАН) и в Пензенском государственном университете (ПГУ). Большая часть материала собрана при непосредственном участии авторов.

Проанализировано 212 образцов *S. major* из 64 локалитетов (табл. 1, рис. 1, Приложение). Видовая принадлежность животных определялась по внешним морфологическим признакам и по характеристикам звукового предупреждающего об опасности сигнала [19, 20]. Также были использованы 11 образцов *S. brevicauda*, один – *S. fulvus*, один – *S. erythrognys* (Приложение).

Геномную ДНК выделяли солевым методом [21] или с депротенинизацией фенолом и хлороформом [22]. В качестве маркера внутривидовой генетической изменчивости использовали нуклеотидные последовательности полноразмерного контрольного региона мтДНК (control region, CR). В реакции амплификации CR использовали модифицированные специфические праймеры MDL [3] и H00651 [23] с пришитыми к 5'-концам олигонуклеотидами для секвенирования M13f и M13r [24] соответственно. ПЦР проводили в 15 мкл реакционной смеси Screen Mix (Evrogen) в плащечном амплификаторе Veriti Termo Cycler (Applied Biosystems, США) при следующих условиях: начальная денатурация 95°C – 5 мин; затем 30 циклов 95°C – 20 с, 62°C – 40 с, 72°C – 60 с, завершающий синтез 72°C – 7 мин. Реакцию секвенирования проводили в 10 мкл реакционной смеси с использованием набора BigDye v.3.1 (Applied Biosystems) с праймерами M13f и M13r по протоколам производителя. Полученные фрагменты

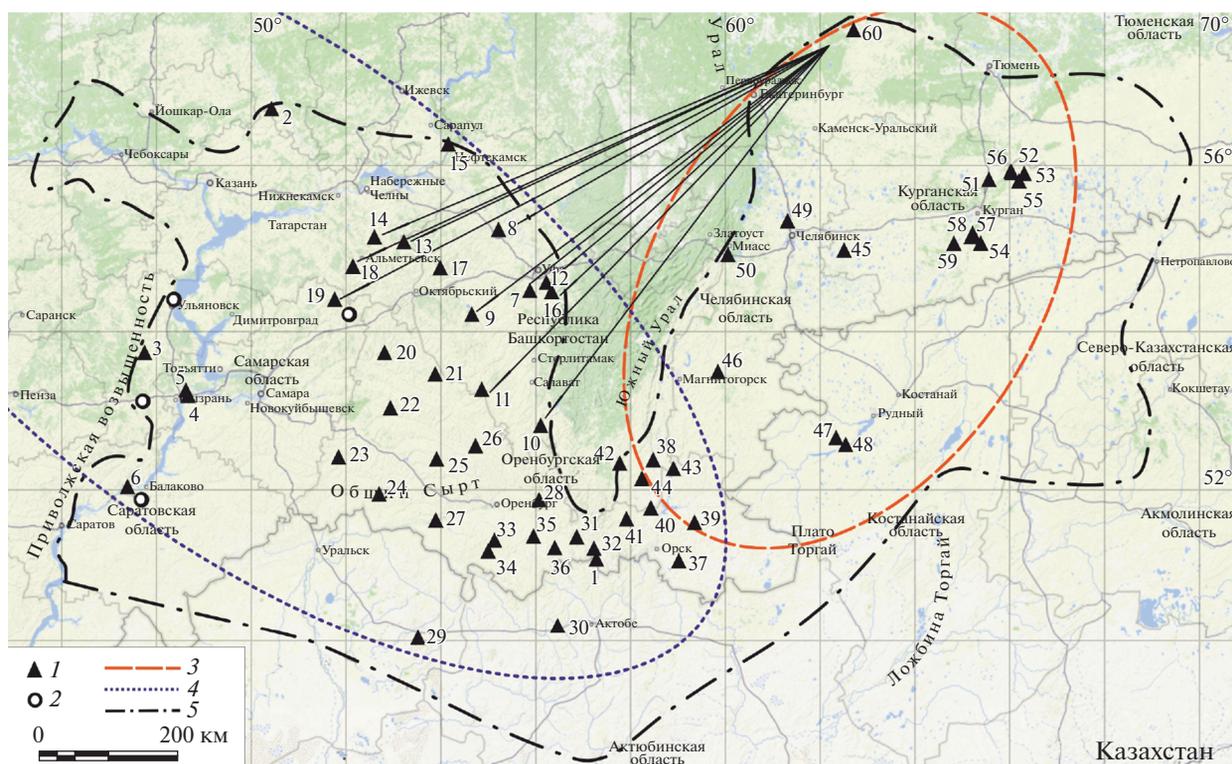


Рис. 1. Места сбора материала. 1 – популяции, в которых обнаружены гаплотипы *S. major*; 2 – популяции большого суслика, в которых обнаружены гаплотипы только других видов; 3 – “восточная” группа популяций; 4 – “западная” группа популяций (см. в тексте); 5 – граница ареала *S. major* (по [1, 18], с изменениями). Номера мест отлова соответствуют номерам популяций в табл. 1 и Приложении. Стрелками обозначены “западные” популяции, с которыми популяция 60 имеет общие гаплотипы.

анализировали на автоматическом генетическом анализаторе ABI 3500 (Applied Biosystems).

Полученные последовательности выравнивали по алгоритму MUSCLE [25] и корректировали вручную в пакете программ MEGA X [26]. Для исключения из выборки интрогрессированных митотипов CR провели кластерный анализ (Neighbour-Joining, NJ) в программе MEGA X всех полученных последовательностей *S. major* с депонированными в базе данных GenBank (NCBI) или секвенированными нами гомологичными последовательностями *S. pygmaeus* (KR673335), *S. suslicus* (KR611438), *S. fulvus* (наши данные), *S. brevicauda* (наши данные) и *S. erythrogegens* (наши данные) (Приложение). Из выборки *S. major* исключались образцы, кластеризующиеся на NJ-дереве с митотипами других видов.

Для отобранных образцов *S. major* был проведен филогенетический анализ. В качестве внешней группы для построения филогенетического дерева использовали 11 секвенированных нами последовательностей CR *S. brevicauda* (Приложение). Выбор наилучшей модели эволюции нуклеотидных последовательностей для анализа по методу максимального правдоподобия (ML) выполнен в программе MEGA X на основе байесов-

ского информационного критерия (BIC). Филогенетические реконструкции (ML) проводили с использованием модели нуклеотидной эволюции HKY + G + I в программе MEGA X. Генетические различия оценивались по попарным дистанциям (*p*-distance). Выбор модели для байесовского филогенетического анализа проведен в программе jModelTest 2.1.10 [27] с применением критерия Акаике (AIC). Байесовский филогенетический анализ (BI) выполнен в программе MrBayes v3.2.6 [28] с использованием модели GTR + G + I на основе 3×10^7 генераций с сохранением каждой 5000-й в двух MCMC-цепях. Реконструкцию завершали при стандартном отклонении разделенных частот в 0.002. Из 120000 полученных деревьев для построения суммарного дерева использовано 90000 с отбрасыванием первых 25%. Устойчивость узлов филогенетических деревьев оценивали, применяя бутстрэп-анализ по 1000 репликам, и при помощи расчета обратных вероятностей. В качестве наименьшего достоверного значения бутстрэп-поддержки ветвей кладограмм принимали 70% и обратных вероятностей – 0.9. Визуализация байесовских деревьев проводилась в программе FigTree v1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>). Построение сети гаплотипов осуществлялось методом меди-

Таблица 1. Характеристика проанализированных выборок *S. major*

Популяция №	Широта	Долгота	n	Коллекционный №/гаплотип CR
1	51.0995	57.2785	1	SP317/h43*
2	56.6655	50.4285	1	SP194/h66*
3	53.7495	47.8309	3	SP506/h35, SP793/h33, SP936/h34**
4	53.2085	48.6640	1	SP716/h33**
5	53.2751	48.6215	1	SP876/h33**
6	52.0460	47.3870	1	SP90/h63*
7	54.5090	55.8743	5	25 351/h62, 25 352/h61, 25 353/h61, 25 354/h49, 25 355/h30
8	55.2453	55.2152	3	25 356/h30, 25 357/h49, 25 358/h02
9	54.2184	54.6527	8	25 366/h65, 25 367/h31, 25 368/h04, 25 369/h02, 25 370/h31, 25 371/h65, 25 372/h57, 25 373/h65
10	52.8294	56.1031	2	25 374/h65, 25 375/h02
11	53.2847	54.8612	2	25 376/h30, 25 377/h02
12	54.6097	56.2237	4	25 347/h26, 25 348/h54, 25 349/h54, 25 350/h26
13	55.0985	53.2206	8	25 323/h54, 25 324/h24, 25 325/h23, 25 326/h54, 25 327/h23, 25 328/h54, 25 329/h54, 25 330/h54
14	55.1599	52.6053	10	25 309/h02, 25 310/h02, 25 311/h29, 25 312/h29, 25 313/h29, 25 314/h29, 25 315/h54, 25 316/h02, 25 317/h54, 25 318/h02
15	56.2573	54.1542	2	SP237/h56, SP238/h67*
16	54.4966	56.3360	2	25 345/h65, 25 346/h65
17	54.7860	53.9840	7	27 148/h46, 27 149/h46, 27 151/h46, 27 152/h46, 27 153/h46, 27 154/h46, 27 155/h46
18	54.8038	52.1434	1	25 319/h24
19	54.4020	51.7591	3	27 163/h27, 27 166/h53, 27 167/h27
20	53.7446	52.8091	6	27 136/h58, 27 137/h58, 27 138/h58, 27 139/h58, 27 140/h25, 27 141/h28
21	53.4779	53.8782	5	27 142/h51, 27 144/h51, 27 145/h51, 27 146/h51, 27 147/h51
22	53.0529	52.9345	3	27 132/h44, 27 133/h64, 27 135/h44
23	52.4275	51.8426	11	27 081/h59, 27 082/h59, 27 083/h59, 27 084/h45, 27 085/h59, 27 086/h59, 27 087/h59, 27 088/h59, 27 089/h45, 27 090/h59, 27 091/h59
24	51.9484	52.6938	1	27 092/h32
25	52.4014	53.9076	8	27 124/h32, 27 125/h32, 27 126/h32, 27 127/h32, 27 128/h32, 27 129/h32, 27 130/h32, 27 131/h32
26	52.5704	54.7307	2	27 122/h52, 27 123/h50
27	51.6114	53.8911	7	27 094/h36, 27 095/h36, 27 096/h36, 27 097/h36, 27 098/h36, 27 099/h36, 27 100/h36
28	51.8749	56.0687	2	27 120/h38, 27 121/h38
29	50.0498	53.5175	2	25 391/h42, 25 392/h42
30	50.2101	56.4618	5	25 394/h47, 25 395/h38, 25 396/h47, 25 397/h47, 25 398/h47
31	51.3922	56.8645	1	SP311/h40*
32	51.2401	57.2276	3	27 111/h36, 27 112/h37, 27 113/h36
33	51.3487	55.1303	1	27 102/h38
34	51.2043	54.9964	1	27 103/h36
35	51.4179	55.9174	2	27 104/h38, 27 105/h38
36	51.2492	56.4016	1	27 109/h39
37	51.0739	59.0155	1	SP321/h55*
38	52.3914	58.4772	3	25 454/h47, 25 455/h05, 25 456/h08

Таблица 1. Окончание

Популяция №	Широта	Долгота	<i>n</i>	Коллекционный №/гаплотип CR
39	51.5819	59.3466	4	27114/h22, 27115/h22, 27116/h22, 27117/h22
40	51.7704	58.4280	1	27118/h38
41	51.6278	57.9141	1	27119/h43
42	52.3483	57.7707	2	25457/h41, 25458/h41
43	52.2789	58.9035	1	25453/h43
44	52.1509	58.2403	3	25459/h47, 25460/h47, 25461/h47
45	54.9962	62.5013	3	25430/h09, 25431/h09, 25432/h07
46	53.5064	59.8426	2	25451/h03, 25452/h03
47	52.6750	62.3331	1	25409/h19
48	52.5865	62.5364	1	25408/h19
49	55.3494	61.3120	5	25433/h08, 25434/h08, 25435/h08, 25436/h08, 25437/h08
50	54.9422	60.0547	13	25438/h01, 25439/h01, 25440/h01, 25441/h01, 25442/h01, 25443/h01, 25444/h01, 25445/h01, 25446/h01, 25447/h01, 25448/h01, 25449/h01, 25450/h01
51	55.8393	65.5574	5	25415/h12, 25416/h12, 25417/h12, 25418/h12, 25419/h12
52	55.9092	66.3034	4	25422/h18, 25423/h18, 25424/h18, 25425/h18
53	55.8237	66.1935	1	25421/h21
54	55.0808	65.3838	2	13312/h16, 13313/h16***
55	55.9235	66.0399	1	25420/h18
56	55.9360	66.0200	2	13340/h21, 13341/h21***
57	55.1610	65.1850	1	13421/h17***
58	55.2020	65.2150	1	13463/h13***
59	55.0783	64.8200	2	25428/h04, 25429/h04
60	57.5658	62.7039	13	25331/h48, 25332/h02, 25333/h04, 25334/h26, 25335/h27, 25336/h54, 25337/h60, 25338/h61, 25339/h54, 25340/h65, 25341/h02, 25342/h02, 25343/h65

Примечание. Образцы с шифром SP хранятся в музейной коллекции ПГУ, остальные – в “Объединенной коллекции тканей диких животных для фундаментальных, прикладных и природоохранных исследований” ИБР РАН. Коллекторы: * О.А. Ермаков, С.В. Титов; ** С.В. Титов, А.А. Шмыров; *** В.П. Стариков; не отмеченные выборки – О.В. Брандлер, А.Р. Тухбатуллин.

анного связывания (Median Joining, MJ) в программе PopART [29].

Анализ генетической изменчивости CR проводился в программе Arlequin v. 3.5.2.2 [30] с вычислением количества гаплотипов (H), общего количества полиморфных позиций (S), общего количества мутаций (η), гаплотипического (h) и нуклеотидного (π) разнообразия, среднего числа попарных отличий (k). Отклонения от модели нейтрально эволюционирующей, демографически стабильной популяции оценивались при помощи F_S -теста [31] на основе коалесцентной симуляции с 1000 повторностями.

Для проверки гипотезы об изоляции расстоянием проведена оценка корреляции между попарными межпопуляционными географическими расстояниями и генетической дифференциацией (F_{ST}) с

помощью теста Мантеля в программе GenAlEx 6.51b2 [32, 33], используя 10000 перестановок.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Нами была определена первичная нуклеотидная последовательность полноразмерного (1005–1008 пн) контрольного региона мтДНК у 212 особей *S. major*, 11 *S. brevicauda* и по одной *S. fulvus* и *S. erythrognys*. Все вновь полученные последовательности депонированы в GenBank с номерами доступа MW149931–MW150003. 13 образцов большого суслика из общей выборки кластеризовались на филогенетическом дереве совместно с гаплотипами контактирующих видов: шесть образцов с *S. pygmaeus* и семь образцов с *S. fulvus* (рис. 2, *a*) и были удалены из дальнейшего анализа. Оставшиеся 199 образцов рыжеватого суслика из 60 локалите-

Таблица 2. Генетическое разнообразие популяций большого суслика *S. major*

Группа популяций	<i>n</i>	<i>H</i>	<i>S/η</i>	<i>h</i> ± SD	<i>π</i> ± SD	<i>k</i>	<i>F_s</i> (<i>p</i>)
“Западная”	142	48	60/63	0.969 ± 0.004	0.0055 ± 0.0029	5.533	–25.03 (<0.01)
“Восточная”	57	21	40/41	0.923 ± 0.022	0.0073 ± 0.0038	7.328	–2.31 (>0.05)
Общая выборка	199	61	72/76	0.974 ± 0.003	0.0069 ± 0.0035	6.957	–24.67 (<0.01)

тов образовали отдельную ветвь на филогенетическом дереве и были приняты нами как собственные гаплотипы *S. major*. В анализируемой выборке *S. major* выявлен 61 гаплотип (соответствие гаплотипов изученным экземплярам см. в табл. 1, Приложении). Содержание нуклеотидов в среднем составило: А – 30.92%, Т – 34.26%, С – 22.88%, G – 11.94%. Смещение нуклеотидного состава в сторону уменьшения доли гуанина на участке контрольного региона мтДНК, по-видимому, характерно для представителей рода *Spermophilus* [34–37]. При сравнении изученных последовательностей обнаружено 59 вариативных сайтов (5.9% от общей длины последовательности), из которых 49 (4.9%) являются парсимониально информативными. Соотношение транзиции/трансверсии в общей выборке составило $R = 7.4$.

Сравнительный анализ (рис. 2,а) показал значительную дифференциацию собственных митотипов *S. major* с контактирующими видами (*p*-дистанции составили от $2.3 \pm 0.4\%$ с *S. brevicauda* до $11.1 \pm 0.9\%$ с *S. pygmaeus*). Филогенетические реконструкции, полученные на основе метода максимального правдоподобия и байесовского анализа, не отличаются по топологии ветвей. Вся выборка образцов *S. major* формирует последовательно ветвящуюся кладу с низкими значениями поддержек основных ветвей (рис. 2,б). В базальной части дерева преобладают гаплотипы, распространенные преимущественно в популяциях, расположенных к востоку от Уральских гор (секция Е на рис. 2,б). Остальные экземпляры образуют единую кладу (секция W на рис. 2,б), в которой преобладают гаплотипы, встречающиеся в западных и центральных популяциях (рис. 1). Обращает на себя внимание популяция 60 из Свердловской области, расположенная к востоку от Урала на северной окраине ареала *S. major*. 13 особей, составляющие выборку из этой популяции, несут девять гаплотипов ($h = 0.936$), семь из которых идентичны или близки гаплотипам, встречающимся в популяциях Татарстана и Северо-Западной Башкирии (рис. 1; 2,б) к западу от Урала. При этом только два из всех гаплотипов свердловской популяции (h02 и h04) относятся к восточной (Е) гаплогруппе, а все остальные (h26, h27, h48, h60, h54, h61, h65) – к западной (W). Представители популяций, расположенных вокруг южной оконечности Уральских гор, имеют в основном гаплотипы гаплогруппы W,

но на юго-восточном макросклоне (популяции 38, 39) встречаются гаплотипы гаплогруппы Е и промежуточный (h22). На основе распределения гаплотипов на дереве популяции для дальнейшего анализа были разделены на две группы: “западную” (популяции 1–44) и “восточную” (45–60).

Сеть гаплотипов (рис. 3) показывает наличие двух близких эволюционных линий, связанных с восточным и западным распространением. Граф сети имеет сложную топологию с циклическими связями и выраженной звездообразной структурированностью, особенно в группе, в которой преобладают образцы из западной части ареала *S. major*. В этой гаплогруппе преобладают единичные замены, отличающие гаплотипы; среднее число нуклеотидных замен в западной группе равно 1.2, в восточной – 1.6.

Средние попарные генетические дистанции (*p*-distance) во всей выборке составили $0.6 \pm 0.1\%$ при среднем числе замен 6.2 ± 1.3 ; в пределах западной и восточной групп популяций – $0.5 \pm 0.1\%$ и $0.7 \pm 0.1\%$ соответственно, а между группами – $0.8 \pm 0.2\%$. Средняя *p*-дистанция между популяциями составила $0.6 \pm 0.01\%$.

Результаты анализа изменчивости CR в популяциях большого суслика приведены в табл. 2. Восточные и западные группы популяций имеют восемь общих гаплотипов CR. Уровень гаплотипического разнообразия (*h*) в группах статистически не различается, но восточные популяции отличаются более высоким (в 1.3 раза) нуклеотидным разнообразием (*π*) и уровнем нуклеотидной изменчивости (*k*). Значения *F_s*-теста отрицательны при анализе общей выборки и “западной” группы популяций, но недостоверны для “восточных” популяций.

Проверка на изоляцию расстоянием выявила существенную корреляцию генетических и географических дистанций в пределах всего ареала (тест Мантеля: $r = 0.57$, $p < 0.01$). При этом такая взаимосвязь проявляется только в западной части ареала ($r = 0.33$, $p < 0.01$), в отличие от восточной ($r = -0.03$, $p > 0.05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

В проводившихся ранее исследованиях молекулярно-генетической изменчивости *S. major* в основном использовались экземпляры из пери-

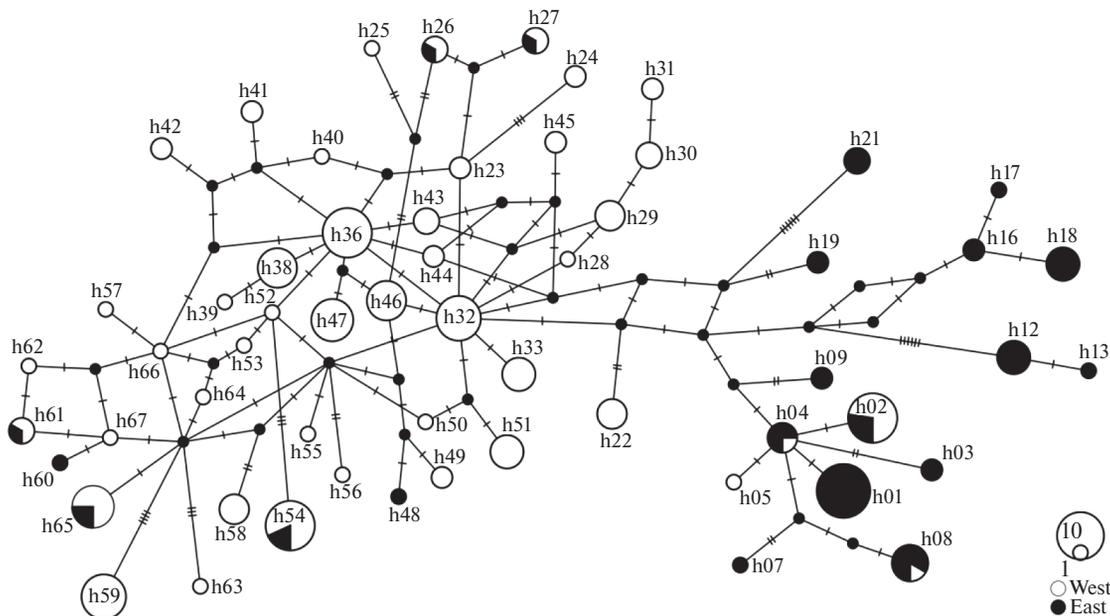


Рис. 3. Сеть (MJ) гаплотипов CR исследованной выборки *S. major*. Обозначения гаплотипов как в табл. 1, Приложении и на рис. 2. Белым цветом обозначена встречаемость гаплотипа в “западной”, черным – в “восточной” группе популяций. Поперечными черточками обозначено число замен между гаплотипами. Величина кружков соответствует объему выборки.

ферических популяций, расположенных в западной и восточной частях ареала в зонах контакта с другими видами [3–7]. Выявленное в этих работах генетическое разнообразие находится под существенным влиянием интрогрессии чужеродных гаплотипов мтДНК в результате гибридизации с другими видами сусликов. В настоящей работе впервые получены подробные данные о генетической изменчивости CR мтДНК *S. major* на территории всего ареала, в том числе в популяциях, удаленных от зон межвидовых контактов.

Обнаруженные в выборке *S. major* гаплотипы CR в целом слабо дифференцированы, отличаются друг от друга малым числом замен (рис. 3, табл. 1), однако проявляют четкие различия с другими видами сусликов (рис. 2,а), находясь с ними на генетических дистанциях, многократно превышающих внутривидовые. Преобладание этих гаплотипов в подавляющем большинстве популяций на протяжении всего ареала вполне позволяет признать митохондриальный геном, ассоциированный с данной гаплотипической группой CR, видоспецифическим для *S. major*. Низкий уровень изменчивости митохондриальных маркеров большого суслика ранее был обнаружен при анализе гипервариабельного сегмента контрольного региона (1.9%) и фрагмента гена COI (0.2%) [4, 12].

Структура обнаруженной генетической изменчивости большого суслика не позволяет выделить строго географически дифференцированные филогруппы по примеру описанных у других

видов равнинных сусликов *S. suslicus* [34, 35] и *S. pygmaeus* [36, 38], которые образуют хорошо обособленные клады, соответствующие “восточным” и “западным” группам популяций. Тем не менее в распределении на дендрограмме и на сети гаплотипов наблюдается тенденция разделения вариантов CR, встречающихся преимущественно на запад и на восток от Уральских гор, генетическая дифференциация между которыми в 5–8 раз ниже, чем у крапчатого и малого сусликов. На существующую пространственную подразделенность популяций указывают и статистически поддержанные результаты теста на изоляцию расстоянием (тест Мантеля).

При оценке барьерной роли Уральского хребта особое значение имеет популяция из Свердловской области (60), расположенная на восток от него на северной границе распространения вида и обладающая уникальным для вида генетическим разнообразием. В ее генофонде объединены гаплотипы как восточной, так и западной гаплогрупп, состав которых указывает на недавнюю активную связь с популяциями Татарстана и Западной Башкирии, отделенными от нее Уральским горным массивом. Расположение этих гаплотипов на дендрограмме свидетельствует в пользу двустороннего обмена. В предыдущих исследованиях в выборке больших сусликов из Свердловской области у пяти особей были обнаружены три варианта трансферрина, что также подтверждает высокую генетическую изменчивость популяций этой части ареала [39]. В качестве возможного

объяснения сходства генотипического состава зауральских (свердловских) и предуральских популяций является предположение их связи в прошлом через Кунгурскую и Красноуфимскую лесостепи Среднего Урала. На этих территориях, представляющих собой островные участки степных и лугово-степных биотопов [40], в первой половине голоцена были широко распространены представители степной фауны. Следуя реконструкции динамики фауны лесостепных участков Среднего Урала, предложенной Н.Г. Смирновым [41], большой суслик мог здесь обитать до начала субатлантического периода, т.е. около 2.5 тыс. лет назад. Возможно допустить периодические контакты предуральских и зауральских северных популяций по долине р. Уфа и межгорным понижениям, которые могли служить коридорами, соединяющими на востоке и западе островную лесостепь с основным ареалом *S. major*.

Современное распространение большого суслика, так же как и смешанное распределение близких гаплотипов в популяциях Южного Предуралья и Мугоджар (популяции 27–43) и малые генетические дистанции между ними (средняя p -дистанция $0.3 \pm 0.02\%$), свидетельствуют об отсуствии или низком уровне изоляции этих популяций и обмене мигрантами.

Обнаруженная генетическая дифференциация популяций с обеих сторон от Южного Урала указывает на его роль, возможно в течение непродолжительного периода, в качестве эколого-географического барьера для большого суслика. В то же время присутствие в “западных” и “восточных” популяциях одних и тех же или имеющих минимальные отличия гаплотипов свидетельствует о неоднократном нарушении их изоляции.

Отрицательные значения F_s -теста указывают на вероятно относительно недавнее увеличение численности популяции и расширение ареала для территории на запад от Урала, но неопределенны для восточной его части ввиду статистической не достоверности (табл. 2). Учитывая низкий уровень внутривидовой дифференциации объединенного пула гаплотипов *S. major*, базальное положение гаплогруппы E и более высокий уровень изменчивости восточных популяций, можно предположить, что эти изменения могли произойти в относительно недалеком прошлом и должны были предваряться редукцией ареала большого суслика до ограниченной территории на востоке современного его распространения с последующей быстрой экспансией в западном направлении.

Подобный сценарий согласуется с представлением о формировании современного ареала *S. major* на Урале в позднем голоцене. Его ископаемые остатки известны из позднего плейстоцена и голоцена Южного и Западного Зауралья [42, 43]. Происхождение *S. major* связывают с крупным

позднеплейстоценовым ископаемым сусликом *S. superciliosus*, найденным на обширной территории от Западной Европы до Среднего Зауралья [19, 44]. Недавние исследования, не выявившие значимых различий между ними [44], позволяют объединять их в единую группу филогенетически близких форм. Принимая эту точку зрения, мы должны признать многократную редукцию предкового ареала данной генеалогической группы в западной части. Палеонтологические данные недостаточны для выявления и хронологизации голоценовых кратковременных сокращений ареала *S. major*. Предположительно наибольшее влияние могли оказать хазарская и хвалынская трансгрессии, когда обширные территории, окружающие Уральский горный массив, скрывались под водой или подтапливались, а возвышенные участки суши покрывались лесами, а также ательская регрессия, характеризующаяся сменой холодных степей в районах Северного Каспия холодными полупустынями, также мало пригодными для обитания мезофитных сусликов [45].

Современное состояние ареала *S. major* находится под воздействием глобальных климатических изменений и под влиянием хозяйственной деятельности человека, приводящих к заселению более южных участков, что сопровождается интрогрессивной гибридизацией с соседними видами [46]. Наблюдаемая фрагментация и сокращение численности популяций [47], по-видимому, приводят к снижению миграции и внутривидового генетического разнообразия, что согласуется с достаточно высоким значением общего популяционного индекса фиксации ($F_{ST} = 0.269, p < 0.01$).

Большинство предыдущих исследований внутривидовой изменчивости, основанных на морфологических признаках, выявляют изменения размеров, окраски и особенностей строения черепа в восточном и юго-восточном направлении [1, 17, 19]. Это нашло отражение в подвидовой систематике, включающей, кроме номинативного, подвид *S. t. argiropuloi* Basch. 1947, распространенный в южной части ареала [16]. Результаты нашего исследования не обнаруживают генетически дифференцированной филогруппы, соответствующей форме *argiropuloi*. Образцы, происходящие из популяций 29 и 30 с описанной территории распространения этого подвида [19] (первая расположена в 100 км от terra typica), объединяются на кладограмме с образцами из популяций с западных и восточных предгорий Южного Урала и Мугоджар. Ожидаемая в данном случае изолирующая роль р. Урал не выявлена. Большие суслики, обитающие на ее разных берегах, не образуют явно выраженных филогрупп.

Авторы выражают благодарность студентам Уральского федерального университета А.С. Новгородцевой, Д.Д. Чемагиной, И.Ф. Арасланову за

помощь в сборе материала. Авторы признательны И.В. Карякину за помощь в организации экспедиционной работы в 2016 г. Авторы благодарны В.П. Старикову, предоставившему образцы тканей сусликов из Курганской области.

Исследование поддержано грантами Российского фонда фундаментальных исследований (№ 16-04-01826, 18-04-00687 и 20-04-00618). Работа выполнялась О.В.Б., А.Р.Т., С.Ю.К. и Д.М.Ш. в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН № 0088-2021-0019. Работа проводилась с использованием фондов “Объединенной коллекции тканей диких животных для фундаментальных, прикладных и природоохранных исследований” и оборудования ЦКП ИБР РАН.

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Огнев С.И. Звери СССР и прилежащих стран. Т. 5. М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1947. 809 с.
2. Павлинов И.Я., Хляп Л.А. Отряд Rodentia // Млекопитающие России: систематико-географический справочник (Сб. трудов Зоологического музея МГУ. Т. 52) / Под ред. Павлинова И.Я., Лисовского А.А. М.: Т-во науч. изданий КМК, 2012. С. 142–312.
3. Ермаков О.А., Титов С.В., Сурин В.Л. и др. Изучение гибридизации четырех видов сусликов (*Spermophilus*: Rodentia, Sciuridae) молекулярно-генетическими методами // Генетика. 2002. Т. 38. № 7. С. 950–964.
4. Ермаков О.А., Титов С.В., Сурин В.Л. и др. Молекулярно-генетический анализ материнских и отцовских линий при гибридизации сусликов (*Spermophilus*: Rodentia, Sciuridae) // Бюл. МОИП. Отд. биол. 2006. Т. 111. № 5. С. 30–35.
5. Титов С.В., Ермаков О.А., Сурин В.Л. и др. Молекулярно-генетическая и биоакустическая диагностика больших (*Spermophilus major* Pallas, 1778) и желтых (*S. fulvus* Lichtenstein, 1823) сусликов из совместного поселения // Бюл. МОИП. Отд. биол. 2005. Т. 110. № 4. С. 72–77.
6. Спиридонова Л.Н., Челомина Г.Н., Стариков В.П. и др. RAPD-PCR-анализ сусликов Тоболо-Ишимского междуречья: свидетельства межвидовой гибридизации большого *Spermophilus major* и краснощекого *S. erythrognus* сусликов // Генетика. 2005. Т. 41. № 9. С. 1210–1221.
7. Спиридонова Л.Н., Челомина Г.Н., Тсуда К. и др. Генетические свидетельства обширной интрогрессии генов короткохвостого суслика в зоне гибридизации *Spermophilus major* и *S. erythrognus*: данные секвенирования гена цитохрома *b* мтДНК // Генетика, 2006. Т. 42. № 7. С. 976–984.
8. Бажанов В.С. Гибриды сусликов (к вопросу о межвидовой гибридизации в природе) // Докл. АН СССР. 1944. Т. 12. № 7. С. 321–322.
9. McEntee J.P., Burleigh J.G., Singhal S. Dispersal predicts hybrid zone widths across animal diversity: Implications for species borders under incomplete reproductive isolation // The Am. Naturalist. 2020. V. 196. № 1. P. 1–21. <https://doi.org/10.1086/709109>
10. Титов С.В., Ермаков О.А., Шмыров А.А. и др. Популяционные особенности межвидовой гибридизации сусликов (*Spermophilus*, Rodentia, Sciuridae) // Бюл. МОИП. Отд. биол. 2006. Т. 111. № 5. С. 36–41.
11. Титов С.В., Шмыров А.А., Кузьмин А.А. Биотопические основы симпатрии и межвидовой гибридизации млекопитающих (на примере рода *Spermophilus*) // Изв. РАН. Сер. биол. 2012. № 1. С. 43–53.
12. Ermakov O.A., Simonov E.P., Surin V.L. et al. Implications of hybridization, NUMTs, and overlooked diversity for DNA barcoding of Eurasian ground squirrels // PLoS One. 2015. V. 10. № 1. e0117201. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117201>
13. Громов И.М., Ербаева М.А. Млекопитающие фауны России и сопредельных территорий. Зайцеобразные и грызуны. СПб.: ЗИН РАН, 1995. 522 с.
14. Кораблев В.П., Фрисман Л.В., Цвирка М.В. и др. Цитологическое и аллозимное исследование сусликов группы “major” (*Spermophilus*, Sciuridae, Rodentia) // Проблемы эволюции. 2003. Т. 5. С. 151–166.
15. Никольский А.А. К вопросу о границе ареалов большого (*Citellus major*) и краснощекого (*S. erythrognus*) сусликов в Северном Казахстане // Зоол. журн. 1984. Т. 63. № 2. С. 1216–1225.
16. Kryštufek B., Vohralík V. Taxonomic revision of the Palearctic rodents (Rodentia): Sciuridae: Xerinae 1 (*Eutamias* and *Spermophilus*) // Lynx n.s. (Praha). 2012. V. 43. № 1/2. P. 17–111.
17. Кузнецов Б.А. Млекопитающие Казахстана. М.: Изд-во МОИП, 1948. 228 с.
18. Афанасьев А.В., Бажанов В.С., Корелов М.Н. и др. Звери Казахстана. Алма-Ата: Изд-во АН Каз. ССР, 1953. 536 с.
19. Громов И.М., Бибииков Д.И., Калабухов Н.И., Мейер М.Н. Наземные белычьи (Marmotinae). Фауна СССР. Млекопитающие. М.-Л.: Наука, 1965. Т. 3. 467 с.
20. Никольский А.А., Румянцев В.Ю. Изменчивость звукового сигнала сусликов группы major (Rodentia, Sciuridae, *Spermophilus*) как модель географического видообразования // Зоол. журн. 2004. Т. 83. № 8. С. 1008–1017.
21. Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. № 22. P. 4692–4693. <https://doi.org/10.1093/nar/25.22.4692>
22. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 398 p.

23. Kocher T.D., Thomas W.K., Meyer A. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 6196–6200.
24. Ekimova I., Korshunova T., Schepetov D. et al. Integrative systematics of northern and Arctic nudibranchs of the genus *Dendronotus* (Mollusca, Gastropoda), with descriptions of three new species // Zool. J. Linnean Society. 2015. V. 173. № 4. P. 841–886. <https://doi.org/10.1111/zoj.12214>
25. Edgar R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput // Nucl. Acids Res. 2004. V. 32. № 5. P. 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
26. Kumar S., Stecher G., Li M. et al. // MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. P. 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
27. Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing // Nat. Methods. 2012. V. 9. № 8. P. 772.
28. Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P. et al. MRBAYES 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model selection across a large model space // Syst. Biol. 2012. V. 61. № 3. P. 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
29. Leigh J.W., Bryant D. POPART: full-feature software for haplotype network construction // Methods Ecol. Evol. 2015. V. 6. № 9. P. 1110–1116. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>
30. Excoffier L., Lischer H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // Mol. Ecol. Res. 2010. V. 10. № 3. P. 564–567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
31. Fu Y.-X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection // Genetics. 1997. V. 147. № 2. P. 915–925.
32. Peakall R., Smouse P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Mol. Ecol. Notes. 2006. V. 6. № 1. P. 288–295. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
33. Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update // Bioinformatics. 2012. V. 28. P. 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
34. Ермаков О.А., Сурин В.Л., Титов С.В. Генетическая изменчивость и дифференциация крапчатого суслика по данным секвенирования контрольного региона мтДНК // Изв. ПГПУ. Естеств. науки. 2011. № 25. С. 176–180.
35. Брандлер О.В., Бирюк И.Ю., Ермаков О.А. и др. Межвидовая и внутривидовая молекулярно-генетическая изменчивость и дифференциация у крапчатых сусликов *Spermophilus suslicus* и *S. odessanus* (Rodentia, Sciuridae, Marmotini) // Вестн. Харьковского нац. унив. им. В.Н. Каразина. Сер. биол. 2015. Вып. 24 (№ 1153). С. 58–67.
36. Ермаков О.А., Симонов Е.П., Сурин В.Л., Титов С.В. Внутривидовой полиморфизм контрольного региона митохондриальной ДНК и филогеография малого суслика (*Spermophilus pygmaeus*, Sciuridae, Rodentia) // Генетика. 2018. Т. 54. № 11. С. 1316–1326.
37. Капустина С.Ю., Адья Я., Брандлер О.В. Генетическая дифференциация даурского суслика *Spermophilus dauricus* Brandt, 1843 по данным изменчивости контрольного региона митохондриальной ДНК // Изв. РАН. Сер. биол. 2018. № 5. С. 494–504. <https://doi.org/10.31857/S086956520002924-9>
38. Ермаков О.А., Титов С.В., Савинецкий А.Б. и др. Молекулярно-генетические и палеоэкологические аргументы в пользу конспецифичности малого (*Spermophilus pygmaeus*) и горного (*Spermophilus musicus*) сусликов // Зоол. журн. 2006. Т. 85. № 12. С. 1474–1483.
39. Nadler Ch.F., Sukernik R.I., Hoffmann R.S. et al. Evolution in ground squirrels. I. Transferrins in Holarctic populations of *Spermophilus* // Comp. Biochem. Physiol. 1974. V. 47A. P. 663–681.
40. Никонова Н.Н., Фамелис Т.В., Шарафутдинов М.И. Разновременные карты растительности (на примере Красноуфимской лесостепи) // Геоботан. картографирование: ежегодник. 1987. С. 26–38.
41. Смирнов Н.Г. Мелкие млекопитающие Среднего Урала в позднем плейстоцене и голоцене. Екатеринбург: УИФ Наука, 1993. 64 с.
42. Кузьмина Е.А. Динамика сообществ мелких млекопитающих Южного Зауралья в позднем плейстоцене и голоцене: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Екатеринбург: ИЭРиЖ УО РАН, 2006. 22 с.
43. Косинцев П.А., Бачура О.П. Формирование современных ареалов млекопитающих Урала в голоцене // Зоол. журн. 2013. Т. 92. № 9. С. 1098–1106.
44. Chemagina D., Strukova T., Pogodina N. et al. Ground squirrels of the genus *Spermophilus* from the Pleistocene and Holocene localities of the Middle and South Urals and Trans-Urals region: the dental features // Historical Biol. 2019. P. 1–14. <https://doi.org/10.1080/08912963.2019.1655010>
45. Свиточ А.А. Регрессивные эпохи большого Каспия // Водные ресурсы. 2016. Т. 43. № 2. С. 134–148.
46. Ермаков О.А., Титов С.В. Динамика границы ареала большого суслика *Spermophilus major* (Rodentia, Sciuridae) в Поволжье // Зоол. журн. 2000. Т. 79. № 4. С. 503–509.
47. Брандлер О.В., Тухбатуллин А.Р. Современное состояние популяций рыжеватого суслика *Spermophilus major* // Актуальные проблемы экологии и природопользования: Сб. науч. трудов XIX Междун. научно-практ. конф. М.: РУДН, 2018. С. 54–58.

Variability of the Mitochondrial DNA Control Region and Phylogeography of Russet Ground Squirrel (*Spermophilus major*, Sciuridae, Rodentia)

O. V. Brandler^{a, *}, A. R. Tukhbatullin^a, S. Yu. Kapustina^a,
D. M. Schepetov^{a, b}, S. V. Titov^c, and O. A. Ermakov^c

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

^b*Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

^c*Department of Zoology and Ecology, Penza State University, Penza, 440026 Russia*

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

A Russet ground squirrel (*Spermophilus major*) is a widespread species with a large area, partially divided by the Ural Ridge into the Eastern and Western parts. Earlier, hybridization was found in secondary contact zones of *S. major* with five other *Spermophilus* species accompanied by a wide introgression of their mitochondrial genomes. In our work, a comparative analysis of the variability of the mtDNA control region of *S. major*, excluding the influence of introgressed haplotypes, was carried out for the first time over the whole range of the species. It is found that species-specific haplotypes of *S. major* are common in all parts of its modern area and have a low level of intraspecific variability. The phylogeographical structure of *S. major* is slightly differentiated and does not form clearly defined geographically localized phyletic lineages. In general, the species' range represents a single genetic space slightly divided by the Ural Mountains. Spatial distribution of haplotypes indicates an exchange between Western and Eastern parts of the range. Data on genetic diversity suggest an expansive character of population growth, possible extension of the range from East to West, and short-term contacts between Pre-Ural and Trans-Ural northern populations. Our results of *S. major* genetic variability analysis do not support the accepted subspecies system.

Keywords: Russet ground squirrel, *Spermophilus major*, mitochondrial genome, mtDNA control region, phylogeography.

УДК 575.162+611.843.1

СПЕКТР И НОВЫЕ ПАТОГЕННЫЕ ВАРИАНТЫ В ГЕНЕ *RS1* У РОССИЙСКИХ БОЛЬНЫХ X-СЦЕПЛЕННЫМ РЕТИНОШИЗИСОМ

© 2021 г. А. А. Степанова¹ *, Е. А. Иванова¹, В. В. Кадышев¹, А. В. Поляков¹

¹Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова, Москва, 115478 Россия

*e-mail: cany@yandex.ru

Поступила в редакцию 26.08.2020 г.

После доработки 13.10.2020 г.

Принята к публикации 14.10.2020 г.

X-сцепленный ювенильный ретиношизис – наследственное заболевание глаз, относящееся к группе ретинальных дистрофий. В данной работе представлены результаты поиска патогенных вариантов в гене *RS1* у 48 неродственных мужчин с диагнозом “X-сцепленный ювенильный ретиношизис”. Молекулярно-генетический диагноз установлен у 77% пробандов. Выявлено 27 различных патогенных вариантов, в том числе восемь новых, ранее не описанных. Спектр мутаций в гене *RS1* у российских больных характеризуется высоким разнообразием и отсутствием мажорных мутаций.

Ключевые слова: ретиношизис, заболевания глаз, *RS1*, *XLRS*.

DOI: 10.31857/S0016675821070134

X-сцепленный ювенильный ретиношизис (*XLRS*; MIM #312700) – наиболее частая причина ювенильной макулярной и ретинальной дегенерации у пациентов мужского пола. Дебют заболевания приходится на первую–вторую декаду жизни и характеризуется развитием прогрессирующих спичеподобных кистозных полостей в центральной зоне сетчатки и характерными изменениями на электроретинограмме (ЭРГ) (снижением b-волны). Фовеальный шиизис (расщепление сетчатки), выглядящий как складки, исходящие из фовеа в виде колеса, является характерным признаком *XLRS* и наблюдается у 98–100% больных. Однако со временем этот признак может стать менее отчетливым [1, 2]. Периферический ретиношизис наблюдается примерно у 50% больных с умеренным сужением границ полей зрения [3].

Первый симптом заболевания – снижение остроты зрения, не поддающееся коррекции. Прогрессирование патологического процесса возможно вплоть до 40–45 лет [2]. На состояние зрительной функции у больных также оказывают влияние возникающие осложнения, такие как витреоретинальные кровоизлияния, неоваскулярная глаукома, хориоидальный склероз и, в редких случаях, атрофия хориоретинального слоя сетчатки, приводящая к слепоте.

Помимо офтальмоскопических изменений глазных доньев могут присутствовать косоглазие, нистагм, осевая гиперметропия, нарушение цветового зрения (красно-зеленая дисхроматопсия) и фовеальная эктопия [4].

Клинический диагноз в некоторых случаях не легко предположить из-за широкого спектра фенотипов, которые включают дегенеративные изменения центральной сетчатки и вторичные осложнения. Даже среди членов одной семьи степень тяжести заболевания может варьировать от легкой до тяжелой формы болезни [5, 6].

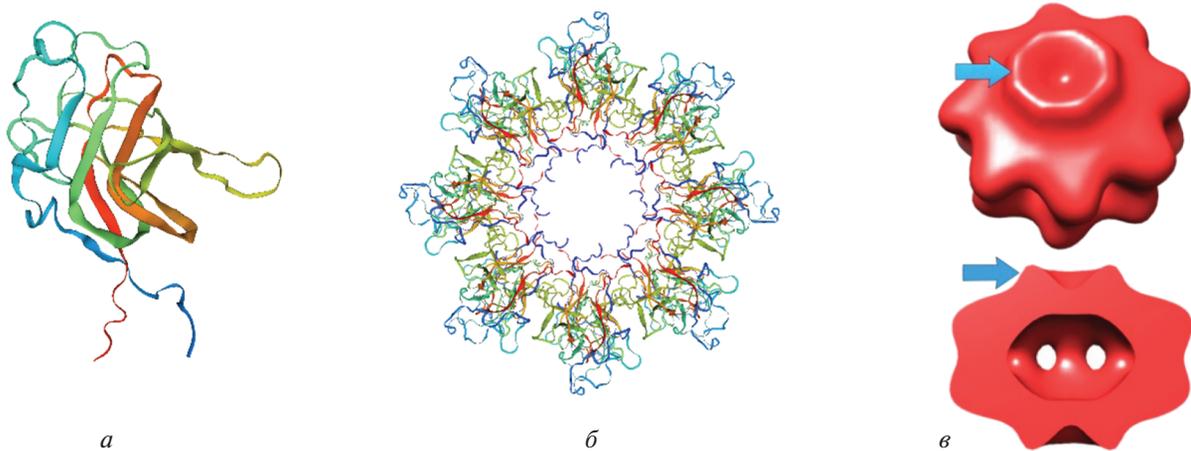
Женщины, являющиеся гетерозиготными носительницами мутаций в гене *RS1*, обычно не имеют никаких клинических признаков болезни [7]. Однако в публикации M. Saldana [8] описана девочка с клинической картиной *XLRS* и вариантом с.305G>A (p.Arg102Gln) в гетерозиготном состоянии, других мутаций в гене *RS1* выявлено не было, исследование неравномерной инактивации X-хромосомы провести не удалось.

Частота распространения ретиношизиса составляет от 1 : 5000 до 1 : 25000 мужчин во всем мире [9].

Причина *XLRS* – мутации в гене *RS1* [10]. Ген *RS1* (MIM *300839) был идентифицирован в 1997 г., содержит шесть экзонов и кодирует специфичный для сетчатки белок ретиношизин, состоящий из 224 аминокислотных остатков, с молекулярной массой 24 кДа. Структура зрелого ретиношизина состоит из N-концевой лидерной последовательности (аминокислотные остатки 1–23), Rsl-домена (аминокислотные остатки 24–63), высококонсервативного дискоидинового домена (аминокислотные остатки 64–219) и C-терминального участка (аминокислотные остатки 220–224) (рис. 1). Лидерная последовательность расщепляется в



Рис. 1. Структура ретиношизина.

Рис. 2. Трехмерная структура ретиношизина [11]. *a* – мономер ретиношизина; *b* – двойная октамерная структура ретиношизина; *в* – два октамера ретиношизина образуют гексадекамер. Домены Rs1 показаны в виде гребня (синяя стрелка).

просвете эндоплазматического ретикулума сигнальной пептидазой, затем обработанный белок собирается в дисульфид-связанный гомооктамерный комплекс для секреции из клеток. Октамер ретиношизина представлен в виде зубчатой кольцевой структуры, в которой домены Rs1 обращены внутрь, тогда как домены дискоидина и особенно их выпуклые шипы обращены наружу. На поверхности клетки два октамера ретиношизина собираются, образуя гексадекамер [11] (рис. 2).

Дискоидиновые домены, впервые идентифицированные в белке дискоидина I *Dictyostelium discoidium* [12], в настоящее время обнаружены во многих секретируемых и трансмембранных белках, включая факторы свертывания крови, рецепторах тирозинкиназы и белках, участвующих в развитии нервной системы [13]. В некоторых белках дискоидиновый домен вовлечен в клеточную адгезию и передачу сигналов клетками через белок-белковые, белково-углеводные или белково-липидные взаимодействия [14]. Функционируя как белок клеточной адгезии, ретиношизин играет решающую роль в поддержании синаптической структуры сетчатки. Во взрослой сетчатке ретиношизин в основном экспрессируется в фо-

торецепторах палочек и колбочек, при секреции локализуется на поверхности фоторецепторов наружной сетчатки и биполярных клеток внутренней сетчатки [15].

На сегодняшний день в базе данных HGMD®Professional версия 2020.1 описано более 303 различных патогенных вариантов в гене *RS1*, вызывающих заболевание X-сцепленный ретиношизис. Из них около 40% – мутации, приводящие к прекращению синтеза белка, LOF (loss of function), включая мутации сайта сплайсинга, нонсенс-мутации, мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания. Оставшиеся 60% представляют собой миссенс-мутации, которые в основном влияют на секрецию ретиношизина и приводят к внутриклеточной деградации белка [16]. Мутации располагаются в гене неравномерно. Наибольшее число мутаций находится в экзонах 4, 5 и 6, кодирующих дискоидиновый домен. В большинстве случаев патогенез заболевания объясняется отсутствием зрелого белка ретиношизина на мембранах сетчатки. Однако при некоторых патогенных вариантах ретиношизин секретируется на поверхность клетки, тогда патогенез объясняется: 1) отсутствием октамеризации и неспецифическим связыванием

Таблица 1. Последовательность праймеров и условия амплификации

Экзон	Последовательность праймеров	Длина фрагмента, пн	Условия амплификации		
			<i>T</i> отжига, °C	MgCl ₂ , мм	число циклов
1	RS1 1F GCCAGGGCTCAACTTAATCC	218	60	1	30
	RS1 1R CAGGCTATATTCCTATTTATCAAC				
2	RS1 2F CCAGAAGGGGTGTTGGTAGC	194			
	RS1 2R CAAAAGTACTATGCATGTACATTACAGCC				
3	RS1 3F CACAGTTGCCTTTGACCGTGAC	252			
	RS1 3R GCGTTCAGGGGGTAAATTCAGC				
4	RS1 4F GTTTTGTATTTCAGTCACCTGGTGC	286			
	RS1 4R GCCACGCTGGTAGAGAGGC				
5	RS1 5F GGGCTTTTTGCAGACATGCAC	303			
	RS1 5R GTCCAGAGGGTGCGAGC				
6	RS1 6F CTCCCCGATGTGATGGTGAC	244			
	RS1 6R CCCGCTCTGTGCCAGTCAC				

с мембраной (замены р.Phe108Cys и р.Arg182Cys), 2) двойной октамеризацией без связывания с мембраной (р.Arg141His), 3) двойной октамеризацией и неспецифическим связыванием с мембраной (р. Arg141Gly, р.His207Gln и р.Arg209His) [17].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для анализа были получены образцы крови от 48 неродственных больных мужского пола из различных регионов России. Больные были обследованы врачами-клиницистами и направлены в лабораторию ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ» с 2015 по 2020 г. для подтверждения диагноза (предварительный диагноз – ретиношизис).

Выделение геномной ДНК из лейкоцитов периферической крови выполняли с помощью набора реактивов Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, США) по протоколу производителя.

У всех больных проводился поиск патогенных вариантов методом прямого автоматического секвенирования по Сенгеру всей кодирующей последовательности и экзон-интронных соединений гена *RS1* (NM_000330.3). Праймеры были выбраны из фланкирующих экзоны гена нуклеотидных последовательностей (табл. 1).

Для секвенирования по Сенгеру использовали фрагменты ДНК, полученные в ходе ПЦР, с применением набора реактивов ABI Dye Terminator, version 1 (Applied Biosystems, США) с последующим анализом на приборе 3130 ABI genetic analyzer (Applied Biosystems). Полученные хроматограммы анализировали с помощью программы Chromas version 2 (Technelysium). Название обна-

руженным изменениям в гене *RS1* присваивалось в соответствии с международной номенклатурой HGVS (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>), использовалась референсная последовательность κДНК, представленная на портале NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>): NM_000330.3.

Популяционная частота выявленных неописанных ранее вариантов была оценена с использованием выборки проектов “1000 геномов”, ESP6500 и Genome Aggregation Database (gnomAD) (v2.1.1).

Клиническая значимость (патогенности) выявленных неописанных ранее вариантов нуклеотидной последовательности была оценена на основании российских рекомендаций для интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS).

Патогенность трех новых миссенс-мутаций была предсказана *in silico* четырьмя программами.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе исследования из 48 неродственных больных ретиношизисом были выявлены патогенные и вероятно патогенные варианты у 37 пробандов, у 11 пробандов генетическая причина заболевания не установлена.

Всего было выявлено 27 различных мутаций, включая 16 миссенс, три нонсенс, три мутации сайта сплайсинга, одну делецию со сдвигом рамки считывания, три делеции целого экзона и одну мутацию в иницирующем кодоне.

Наибольшее количество мутаций встретилось в экзоне 6 (20), включая две делеции всего экзона,

Таблица 2. Выявленные варианты в гене *RS1*

Вариант	Эффект	Экзон/ интрон	Число поврежденных хромосом	Доля, %	Источник
c.3G>A	p.M1?	1	1	2.7	[18]
c.(87+1_88-1)_(113+1_114-1)del	Делеция экзона 2	2	1	2.7	?
c.141_142insAT	p.Ala48Metfs*79	3	1	2.7	Не описан
c.120C>A	p.Cys40*	3	1	2.7	[10]
c.184+2T>A	Splicing	in3	1	2.7	Не описан
c.185-1G>C	Splicing	in3	1	2.7	[19]
c.185-1G>T	Splicing	in3	1	2.7	Не описан
c.274T>G	p.Trp92Gly	4	1	2.7	[20]
c.304C>T	p.Arg102Trp	4	1	2.7	[10]
c.305G>A	p.Arg102Gln	4	1	2.7	[19]
c.337C>T	p.Leu113Phe	5	1	2.7	[19]
c.365G>A	p.Trp122*	5	1	2.7	Не описан
c.422G>A	p.Arg141His	5	1	2.7	[19]
c.421C>T	p.Arg141Cys	5	2	5.4	[19]
c.425G>A	p.Cys142Tyr	5	1	2.7	Не описан
c.511G>C	p.Gly171Arg	5	1	2.7	»
c.554C>A	p.Thr185Lys	6	1	2.7	[21]
c.577C>T	p.Pro193Ser	6	2	5.4	[22]
c.587C>T	p.Ser196Phe	6	1	2.7	Не описан
c.589C>T	p.Arg197Cys	6	1	2.7	[19]
c.598C>T	p.Arg200Cys	6	1	2.7	[19]
c.608C>T	p.Pro203Leu	6	4	10.8	[19]
c.637C>T	p.Arg213Trp	6	4	10.8	[19]
c.638G>A	p.Arg213Gln	6	3	8.1	[23]
c.657C>A	p.Cys219*	6	1	2.7	Не описан
NG_008659.2:g.(?_34948)_(37416_?)del	Делеция экзона 6	6	1	2.7	»
NG_008659.2:g.(?_34948)_(37416_?)del	Делеция экзона 6	6	1	2.7	»

далее по убыванию в экзоне 5 (7), экзоне 3 и его акцепторном сайте сплайсинга (4), в экзоне 4 (3), в экзоне 1 (1), делеция экзона 2 (1) и мутация в донорном сайте сплайсинга экзона 2 (1) (табл. 2, рис. 3).

Пять из ранее описанных вариантов встретились более чем один раз: c.608C>T (p.Pro203Leu), c.637C>T (p.Arg213Trp), c.638G>A (p.Arg213Gln), c.577C>T (p.Pro193Ser), c.421C>T (p.Arg141Cys).

Выявлено восемь ранее неописанных однонуклеотидных замен: c.141_142insAT (p.Ala48Metfs*79), c.185-1G>T, c.184+2T>A, c.365G>A (p.Trp122*), c.425G>A (p.Cys142Tyr), c.511G>C (p.Gly171Arg), c.587C>T (p.Ser196Phe), c.657C>A (p.Cys219*). А также нами были выявлены крупные делеции у троих пациентов: у двоих делеция экзона 6 (NG_008659.2:g.(?_34948)_(37416_?) del) и у одного больного делеция экзона 2 (c.(87+1_88-1)_(113+1_114-1)del).

В базе данных HGMD®Professional описаны делеции, затрагивающие экзон 2, однако не описано ни одной крупной делеции, включающей весь экзон 6. В настоящем исследовании не были определены точки разрыва, и неизвестно была ли наблюдаемая нами делеция экзона 2 идентична известным делециям экзона 2 на уровне ДНК и одинаковые ли делеции экзона 6.

ОБСУЖДЕНИЕ

Нами была установлена генетическая причина заболевания у 77% больных с направляющим (предварительным) диагнозом “X-сцепленный ретиношизис”. У 11 больных не была выявлена генетическая причина заболевания, что может свидетельствовать как о вариантах, расположенных в интронных и регуляторных областях гена,

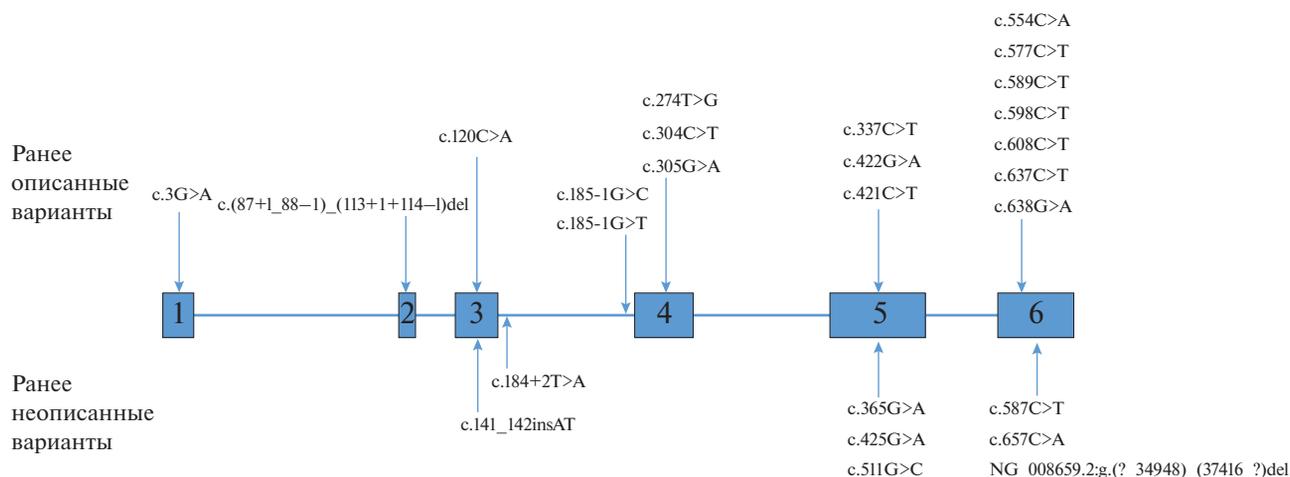


Рис. 3. Локализация выявленных вариантов.

так и о том, что заболевание не связано с геном *RS1* и ретиношизис у этих больных является симптомом другого заболевания. Более высокая выявляемость мутаций в других популяциях (табл. 3) также подтверждает версию о более строгих клинических критериях отбора пациентов для постановки диагноза “X-сцепленный ретиношизис”. Несмотря на вышеизложенное, информативность настоящего исследования достаточно высокая, что свидетельствует о характерной клинической картине у междисциплинарно обследованных пациентов и о том, что большая часть патогенных вариантов в гене *RS1* хорошо выявляется методом секвенирования по Сенгеру.

В исследуемой группе пациентов были идентифицированы практически все типы мутаций гена *RS1*. Большинство мутаций были миссенс (59%, 16/27), что согласуется с предыдущими публикациями [15, 16]. Значительная доля вариантов (30%, 8/27), не считая крупных делеций, ранее не была описана.

Варианты, выявленные в исследовании, не были распределены случайным образом по гену. Большинство из обнаруженных нами вариантов (18/27) были расположены в экзонах 4–6, кодирующих высококонсервативный дискоидиновый домен

белка *RS1*, который считается критическим для функционирования ретиношизина (табл. 4). В целом полученные результаты согласуются с ранее проведенными исследованиями (HGMD), небольшие различия по экзонам можно объяснить величиной исследуемой выборки.

Наиболее частыми мутациями в изученной выборке больных стали миссенс-замены экзона 6 — c.608C>T (p.Pro203Leu) и c.637C>T (p.Arg213Trp). Каждая из этих замен встретилась у четырех больных. Доля составила 10.8%. Данные замены не являются частыми в других популяциях.

Вариант c.608C>T (p.Pro203Leu) встретился 2 раза у японских [29] и испанских [30] больных, по одному разу у индийских [31], финских [21] и канадских [32] больных. У испанских больных с помощью анализа гаплотипов было доказано независимое происхождение мутаций [30].

Миссенс-замена p.Arg213Trp вызвана транзицией С на Т в 637-м положении гена *RS1*, приводящей к аминокислотной замене аргинина на триптофан в 213-м положении белка. Эта миссенс-замена меняет положительно заряженный аргинин на неполярный триптофан, тем самым изменяя заряд белка. Предполагается, что вари-

Таблица 3. Информативность исследования гена *RS1* у больных ретиношизисом в различных странах

Страна	Число больных	Число подтвержденных случаев	Информативность, %	Источник
Австралия	18	16	89	[24]
Польша	10	10	100	[25]
США	31	28	90	[26]
Япония	11	11	100	[27]
Китай	30	28	93	[28]

Таблица 4. Распределение патогенных вариантов по гену *RS1*

Патогенные варианты в гене <i>RS1</i>		Настоящее исследование		База данных HGMD	
		число вариантов	доля, %	число вариантов	доля, %
Точковые замены и маленькие делеции/инсерции	Экзон 1	1	3.7	14	4.6
	Экзон 2	0	0.0	6	2.0
	Экзон 3	2	7.4	14	4.6
	Экзон 4	3	11.1	65	21.5
	Экзон 5	6	22.2	77	25.4
	Экзон 6	9	33.3	68	22.4
	Мутации сайта сплайсинга	3	11.1	25	8.3
Крупные делеции/инсерции/перестройки		3	11.1	34	11.2

ант с.637C>T может мешать сворачиванию белка, приводя к аномальной конформации и задержке мутантного белка во внутриклеточном пространстве, что приводит к отсутствию ретиношизина в сетчатке у пораженных мужчин и к фенотипу ретиношизиса [33]. Вариант с.637C>T (p.Arg213Trp) также встречается у больных из различных популяций [6, 31, 34], но ни в одной из популяций не является мажорным.

У троих больных встретился вариант с.638G>A, приводящий к миссенс-замене аргинина на глутамин также в 213-м положении белка. Аллельная частота выявленного варианта составила 6.25%. В настоящем исследовании с.638G>A встретился у больных из различных этнических групп, что свидетельствует в пользу того, что повторяющиеся случаи встречаемости варианта объясняются “горячими” точками гена, а не эффектом основателя. Ранее вариант с.638G>A 1–2 раза встретился в испанской [30], китайской [35], японской [29] популяциях.

Миссенс-замена p.Pro193Ser возникает вследствие транзиции С на Т в 577-м положении гена *RS1*. В публикации Y.V. Sergeev с соавт. [33] показано, что замена пролина на серин в 193-м положении белка влияет на стойкость конформации белка, а не на изменение вторичной структуры, и, как следствие, ожидается, что белок будет секретироваться из клетки. Данный вариант описан у китайского больного с “мягким” течением болезни [22].

На двух хромосомах нами был выявлен вариант с.421C>T. Транзиция С на Т в 421-м положении гена приводит к аминокислотной замене аргинина на цистеин в 141-м положении белка – p.Arg141Cys. Между цистеинами в белке создаются дисульфидные мостики; появляясь в 141-м положении новый цистеин является конкурентом для Cys142 и может образовывать дисульфидную связь с

Cys110, влияя на стабильность конформации [33]. В материалах консорциума ретиношизиса 1998 г. наличие данного варианта было показано у немецкого больного, двух датских, двух французских больных [19], а также он встретился у пяти больных из Великобритании [36] и из США [37].

Остальные ранее описанные патогенные варианты в настоящем исследовании встретились по одному разу: с.3G>A (p.M1?), с.120C>A (p.Cys40*), с.274T>G (p.Trp92Gly), с.304C>T (p.Arg102Trp), с.305G>A (p.Arg102Gln), с.337C>T (p.Leu113Phe), с.422G>A (p.Arg141His), с.554C>A (p.Thr185Lys), с.589C>T (p.Arg197Cys), с.598C>T (p.Arg200Cys), с.657C>A (p.Cys219*), с.185-1G>C, делеция экзона 2 – с.(87+1_88-1)_(113+1_114-1)del).

Все эти варианты ранее встречались в различных популяциях мира с различной частотой. Однако ни один из этих вариантов не являлся мажорным в какой-либо выборке больных с превалирующей частотой. Только вариант с.304C>T (p.Arg102Trp) встретился с достаточно высокой частотой у больных из Великобритании на шести хромосомах (17%) [36] и у китайских больных на трех хромосомах (10%) [35].

Все ранее неописанные как патогенные варианты встретились у больных по одному разу (табл. 5). Для делеций экзона 6 (NG_008659.2: g.(?_34948)_(37416_?)del) не были определены точки разрыва, поэтому нельзя сказать повторяющийся ли этот вариант или нет. Пять из восьми точковых вариантов были выявлены в “горячих” экзонах гена – в экзонах 5 и 6, крупные делеции также затрагивали экзон 6. Один вариант встретился в экзоне 3, один – в донорном сайте сплайсинга экзона 3 (с.184+2T>A) и один – в акцепторном сайте сплайсинга экзона 4 (с.185-1G>T).

Инсерция двух нуклеотидов с.141_142insAT в экзоне 3 приводит к сдвигу рамки считывания и

Таблица 5. Ранее неописанные варианты в *RS1* и их патогенность

Вариант	Эффект	Экзон/ интрон	Число хромосом	Критерии патогенности	Патогенность
c.141_142insAT	p.Ala48Metfs*79	3	1	PVS1, PM2	Вероятно патогенный
c.185-1G>T	Splicing	in3	1	PVS1, PM2	»
c.184+2T>A	Splicing	in3	1	PVS1, PM2	»
c.365G>A	p.Trp122*	5	1	PVS1, PM1, PM2	Патогенный
c.425G>A	p.Cys142Tyr	5	1	PM1, PM2, PM5, PP2, PP3	Вероятно патогенный
c.511G>C	p.Gly171Arg	5	1	PM1, PM2, PP2, PP3	»
c.587C>T	p.Ser196Phe	6	1	PM1, PM2, PP2, PP3	»
c.657C>A	p.Cys219*	6	1	PVS1, PM1, PM2	Патогенный
NG_008659.2:g.(?_34948)_ (37416_?)del	Делеция экзона 6	6	1	PVS1, PM1, PM2	»
NG_008659.2:g.(?_34948)_ (37416_?)del	Делеция экзона 6	6	1	PVS1, PM1, PM2	»

образованию преждевременного стоп-кодона в 79-м положении белка. Выявленный вариант нуклеотидной последовательности не зарегистрирован в контрольных выборках “1000 геномов”, ESP6500 и gnomAD (The Genome Aggregation Database). Согласно рекомендациям по интерпретации данных [38] выявленный вариант нуклеотидной последовательности следует расценивать как вероятно патогенный (PVS1, PM2).

Варианты c.185-1G>T и c.184+2T>A находятся в канонических сайтах сплайсинга. Данные варианты нуклеотидной последовательности не зарегистрированы в контрольных выборках “1000 геномов”, ESP6500 и gnomAD (The Genome Aggregation Database). Согласно рекомендациям по интерпретации данных [38] выявленные варианты нуклеотидной последовательности следует расценивать как вероятно патогенные (PVS1, PM2).

Замены c.365G>A и c.657C>A приводят к образованию преждевременного стоп-кодона – p.Trp122* и p.Cys219* соответственно. Замены расположены в “горячих” экзонах гена *RS1*, не зарегистрированы в контрольных выборках “1000 геномов”, ESP6500 и gnomAD (The Genome Aggregation Database). Согласно рекомендациям по интерпретации данных [38] выявленные варианты нуклеотидной последовательности следует расценивать как патогенные (PVS1, PM1, PM2).

К миссенс-заменам p.Cys142Tyr, p.Gly171Arg, p.Ser196Phe приводят варианты нуклеотидной последовательности c.425G>A, c.511G>C, c.587C>T соответственно. Варианты расположены в “горячих” экзонах гена *RS1*. Выявленные варианты не зарегистрированы в контрольных выборках “1000 геномов”, ESP6500 и gnomAD (The Genome Aggregation Database). В гене *RS1* миссенс-варианты

обычно вызывают заболевание, а доброкачественные изменения встречаются редко [36]. Алгоритмы предсказания патогенности MutationTaster [39], FATHMM [40], LRT [41], DEOGEN2 [42] оценивают данные варианты как патогенные. Миссенс-вариант c.425G>A (p.Cys142Tyr) приводит к изменению аминокислоты в том же положении, в котором ранее были описаны варианты c.424T>C (p.Cys142Arg) [33] и c.426T>G (Cys142Trp) как патогенные [26]. Таким образом, согласно рекомендациям по интерпретации данных [38] выявленные варианты нуклеотидной последовательности следует расценивать как вероятно патогенные (PM1, PM2, PP2, PP3, для c.425G>A еще PM5).

Делеции NG_008659.2:g.(?_34948)_ (37416_?)del “горячего” экзона 6 приводят к отсутствию фрагмента высококонсервативного дискоидинового домена. Выявленные варианты не зарегистрированы в контрольной выборке gnomAD (The Genome Aggregation Database). Согласно рекомендациям по интерпретации данных [38] выявленные варианты нуклеотидной последовательности следует расценивать как патогенные (PVS1, PM1, PM2).

Таким образом, все выявленные нами варианты нуклеотидной последовательности гена *RS1*, ранее неописанные как патогенные, мы классифицировали как патогенные и вероятно патогенные.

Полученные данные показывают, что для российских больных XLRS не характерно наличие “мажорных” мутаций в гене *RS1*, что свойственно практически всем популяциям. Только у финских больных патогенный вариант c.214G>A (p.Glu72Lys) встречается у 70% больных [21], что объясняется изолированностью популяции.

В настоящее время разработка генной терапии для лечения XLRS достигла стадии клинических испытаний [43] и знание точного генетического дефекта у конкретного пациента позволит применить эффективное патогенетическое лечение. Выявление мутаций, вызывающих болезнь у пациентов с XLRS, также необходимо для медико-генетического консультирования (прогноза заболевания, прогноза потомства, возможности предимплантационной диагностики) и разработки корректного лечебно-профилактического алгоритма. Поиск патогенных вариантов методом прямого автоматического секвенирования по Сенгеру является необходимым и достаточным инструментом для установления генетической причины заболевания XLRS.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Минобрнауки России.

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

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. George N.D., Yates J.R., Moore A.T. Clinical features in affected males with X-linked retinoschisis // *Arch. Ophthalmol.* 1996. V. 114. P. 274–280.
2. Kellner U., Brummer S., Foerster M.H., Wessing A. X-linked congenital retinoschisis // *Graefe's Arch. Ophthalmol.* 1990. V. 228(5). P. 432–437.
3. Tantri A., Vrabec T.R., Cu-Unjieng A. et al. X-linked retinoschisis: A clinical and molecular genetic review // *Surv. Ophthalmol.* 2004. V. 49(2). P. 214–230. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2003.12.007>
4. Mooy C.M., Van Den Born L.I., Baarsma S. et al. Hereditary X-linked juvenile retinoschisis: a review of the role of Müller cells // *Arch. Ophthalmol.* 2002. V. 120(7). P. 979–984.
5. Eksandh L.C., Ponjavic V., Ayyagari R. et al. Phenotypic expression of juvenile X-linked retinoschisis in Swedish families with different mutations in the XLRS1 gene // *Arch. Ophthalmol.* 2000. V. 118(8). P. 1098–1104. <https://doi.org/10.1001/archophth.118.8.1098>
6. Xu J., Gu H., Ma K. et al. R213W mutation in the retinoschisis 1 gene causes X-linked juvenile retinoschisis in a large Chinese family // *Mol. Vis.* 2010. V. 12. P. 1593–1600.
7. Deutman A.F. The Hereditary Dystrophies of the Posterior Pole of the Eye. Amsterdam: Von Gorcum and Company, 1971. 484 p.
8. Saldana M., Thompson J., Monk E. et al. X-linked retinoschisis in a female with a heterozygous *RS1* missense mutation // *Am. J. Med. Genet.* 2007. V. 143A. P. 608–609. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.31568>
9. Sikkink S.K., Biswas S., Parry N.R. et al. X-linked retinoschisis: an update // *J. Med. Genet.* 2007. V. 44. P. 225–232.
10. Sauer C.G., Gehrig A., Warneke-Wittstock R. et al. Positional cloning of the gene associated with X-linked juvenile retinoschisis // *Nat. Genet.* 1997. V. 17. P. 164–170.
11. Tolun G., Vijayarathy C., Huang R. et al. Paired octamer rings of retinoschisin suggest a junctional model for cell-cell adhesion in the retina // *PNAS.* 2016. V. 113(19). P. 5287–5292. <https://doi.org/10.1073/pnas.1519048113>
12. Poole S., Firtel R.A., Lamar E., Rowekamp W. Sequence and expression of the discoidin I gene family in *Dictyoselium discoideum* // *J. Mol. Biol.* 1981. V. 153(2). P. 273–289. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90278-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90278-3)
13. Baumgartner S., Hofmann K., Chiquet-Ehrismann R., Bucher P. The discoidin domain family revisited: New members from prokaryotes and a homology-based fold prediction // *Protein Sci.* 1998. V. 7(7). P. 1626–1631. <https://doi.org/10.1002/pro.5560070717>
14. Pratt K., Shen B., Takeshima K. et al. Structure of the C2 domain of human factor VIII at 1.5 Å resolution // *Nature.* 1999. V. 402. P. 439–442. <https://doi.org/10.1038/46601>
15. Wu W.W., Molday R.S. Defective discoidin domain structure, subunit assembly, and endoplasmic reticulum processing of retinoschisin are primary mechanisms responsible for X-linked retinoschisis // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 28139–28146. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302464200>
16. Molday R.S., Kellner U., Weber B.H. X-linked juvenile retinoschisis: clinical diagnosis, genetic analysis, and molecular mechanisms // *Prog. Retin. Eye Res.* 2012. V. 31(3). P. 195–212. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2011.12.002>
17. Plössl K., Schmid V., Straub K. et al. Pathomechanism of mutated and secreted retinoschisin in X-linked juvenile retinoschisis // *Exp. Eye Res.* 2018. V. 177. P. 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2018.07.021>
18. Xiao Y., Liu X., Tang L. et al. X-linked retinoschisis: Phenotypic variability in a Chinese family // *Sci. Rep.* 2016. V. 29(6). P. 20118. <https://doi.org/10.1038/srep20118>
19. Functional implications of the spectrum of mutations found in 234 cases with X-linked juvenile retinoschisis (XLRS) // *Hum. Mol. Genet.* 1998. V. 7(7). P. 1185–1192. <https://doi.org/10.1093/hmg/7.7.1185>
20. Lamey T., Laurin S., Chelva E., De Roach J. Genotypic analysis of X-linked retinoschisis in Western Australia // *Retinal Degenerative Diseases. Advances in Experi-*

- mental Medicine and Biology / Eds Anderson R., Hollyfield J., LaVail M. N.Y.: Springer, 2010. V. 664. P. 283–291.
21. *Huopaniemi L., Rantala A., Forsius H. et al.* Three widespread founder mutations contribute to high incidence of X-linked juvenile retinoschisis in Finland // *Eur. J. Hum. Genet.* 1999. V. 7(3). P. 368–376. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200300>
 22. *Chan W.M., Choy K.W., Wang J. et al.* Two cases of X-linked juvenile retinoschisis with different optical coherence tomography findings and *RS1* gene mutations // *Clin. & Exp. Ophthalmol.* 2004. V. 32. P. 429–432. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9071.2004.00820.x>
 23. *Hotta Y., Fujiki K., Hayakawa M. et al.* Japanese juvenile retinoschisis is caused by mutations of the *XLRS1* gene // *Hum. Genet.* 1998. V. 103. P. 142–144. <https://doi.org/10.1007/PL00008705>
 24. *Hewitt A.W., FitzGerald L.M., Scotter L.W. et al.* Genotypic and phenotypic spectrum of X-linked retinoschisis in Australia // *Clin. Exp. Ophthalmol.* 2005. V. 33(3). P. 233–239. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9071.2005.01018.x>
 25. *Skorczyk A., Krawczyński M.R.* Four novel *RS1* gene mutations in Polish patients with X-linked juvenile retinoschisis // *Mol. Vis.* 2012. V. 18. P. 3004–3012.
 26. *Hiriyanna Kelaginamane T., Bingham E.L., Yashar Beverly M. et al.* Novel mutations in *XLRS1* causing retinoschisis, including first evidence of putative leader sequence change // *Hum. Mut.* 1999. P. 14(5). V. 423–427.
 27. *Mashima Y., Shinoda K., Ishida S. et al.* Identification of four novel mutations of the *XLRS1* gene in Japanese patients with X-linked juvenile retinoschisis // *Hum. Mutat.* 1999. V. 13(4). P. 338. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(1999\)13:4<338::AID-HUMU16>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1999)13:4<338::AID-HUMU16>3.0.CO;2-0)
 28. *Hu Q.R., Huang L.Z., Chen X.L. et al.* Genetic analysis and clinical features of X-linked retinoschisis in Chinese patients // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 44060. <https://doi.org/10.1038/srep44060>
 29. *Kondo H., Oku K., Katagiri S. et al.* Novel mutations in the *RS1* gene in Japanese patients with X-linked congenital retinoschisis // *Hum. Genome Var.* 2019. V. 8(6). P. 3. <https://doi.org/10.1038/s41439-018-0034-6>
 30. *Riveiro-Alvarez R., Trujillo-Tiebas M.J., Gimenez-Pardo A. et al.* Correlation of genetic and clinical findings in Spanish patients with X-linked juvenile retinoschisis // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2009. V. 50(9). P. 4342–4350. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-3418>
 31. *Suganthalakshmi B., Shukla D., Rajendran A. et al.* Genetic variations in the hotspot region of *RS1* gene in Indian patients with juvenile X-linked retinoschisis // *Mol. Vis.* 2007. V. 19(13). P. 611–617.
 32. *Gerth C., Zawadzki R.J., Werner J.S., Héon E.* Retinal morphological changes of patients with X-linked retinoschisis evaluated by Fourier-domain optical coherence tomography // *Arch. Ophthalmol.* 2008. V. 126(6). P. 807–811. <https://doi.org/10.1001/archophth.126.6.807>
 33. *Sergeev Y.V., Caruso R.C., Meltzer M.R. et al.* Molecular modeling of retinoschisin with functional analysis of pathogenic mutations from human X-linked retinoschisis // *Hum. Mol. Genet.* 2010. V. 19(7). P. 1302–1313. Epub 2010 Jan 8. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq006>
 34. *Sieving P.A., Bingham E.L., Kemp J. et al.* Juvenile X-linked retinoschisis from *xlrs1 arg213trp* mutation with preservation of the electroretinogram scotopic b-wave // *Am. J. Ophthalmol.* 1999. V. 128. P. 179–184.
 35. *Chen J., Xu K., Zhang X. et al.* Novel mutations of the *RS1* gene in a cohort of Chinese families with X-linked retinoschisis // *Mol. Vis.* 2014. V. 31(20). P. 132–139.
 36. *Pimenides D., George N.D., Yates J.R. et al.* X-linked retinoschisis: Clinical phenotype and *RS1* genotype in 86 UK patients // *J. Med. Genet.* 2005. V. 42(6). P. e35. <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.029769>
 37. *Stone E.M., Andorf J.L., Whitmore S.S. et al.* Clinically focused molecular investigation of 1000 consecutive families with inherited retinal disease // *Ophthalmology.* 2017. V. 124(9). P. 1314–1331. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2017.04.008>
 38. *Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б. и др.* Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) // *Мед. генетика.* 2019. Т. 18(2). С. 3–23. <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2019.02.3-23>
 39. *Schwarz J.M., Rodelsperger C., Schuelke M., Seelow D.* MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations // *Nat. Methods.* 2010. V. 7. P. 575–576.
 40. *Shihab H.A., Gough J., Cooper D.N. et al.* Predicting the functional, molecular, and phenotypic consequences of amino acid substitutions using hidden Markov models // *Hum. Mut.* 2013. V. 34. P. 57–65.
 41. *Chun S., Fay J.C.* Identification of deleterious mutations within three human genomes // *Genome Res.* 2009. V. 19. P. 1553–1561.
 42. *Raimondi D., Tanyalcin I., Féré J. et al.* DEOGEN2: prediction and interactive visualization of single amino acid variant deleteriousness in human proteins // *Nucl. Acids Res.* 2017. V. 45(W1). P. W201–W206.
 43. *Hafner B.P.* Clinical progress in inherited retinal degenerations: Gene therapy clinical trials and advances in genetic sequencing // *Retina.* 2017. V. 37(3). P. 417–423. <https://doi.org/10.1097/IAE.0000000000001341>

The Spectrum and Novel Mutations in *RS1* Gene in a Russian Cohort of Patients with X-Linked Retinoschisis

A. A. Stepanova^{a,*}, E. A. Ivanova^a, V. V. Kadyshev^a, and A. V. Polyakov^a

^aResearch Centre for Medical Genetics, Moscow, 115478 Russia

*e-mail: cany@yandex.ru

X-linked juvenile retinoschisis is a hereditary eye disease that belongs to the group of retinal dystrophy. This study presents the results of the search for mutations in the *RS1* gene in 48 unrelated men diagnosed with X-linked juvenile retinoschisis. Molecular genetic diagnosis was found in 77% of the probands. Revealed 27 different pathogenic variants, including 8 novel, previously not described. The spectrum of mutations in the *RS1* gene in Russian cohort of patients is characterized by high diversity and the absence of major mutations.

Keywords: retinoschisis, eye disorders, *RS1*, XLRS.

ВЛИЯНИЕ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *ADAMTS1* НА РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫЙ ОТВЕТ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ HeLa

© 2021 г. Р. Р. Савченко^{1, *}, А. А. Мурашкина², В. С. Фишман³, Е. С. Сухих^{4, 5},
А. В. Вергинский^{4, 5}, Л. Г. Сухих⁵, О. Л. Серов³, И. Н. Лебедев¹, С. А. Васильев¹

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

²Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, 634050 Россия

³Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

⁴Томский областной онкологический диспансер, Томск, 634063 Россия

⁵Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Томск, 634050 Россия

*e-mail: renata.savchenko@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 02.09.2020 г.

После доработки 20.01.2021 г.

Принята к публикации 18.02.2021 г.

Проведен анализ влияния дифференциальной экспрессии гена *ADAMTS1* на радиационно-индуцированный ответ в клеточных линиях HeLa с нокаутом и сверхэкспрессией гена *ADAMTS1*. Клеточная линия с нокаутом гена была получена с помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9. Сверхэкспрессия гена *ADAMTS1* обеспечивалась с помощью временной трансфекции плазмиды, содержащей кодирующую последовательность изучаемого гена. После воздействия на клеточные линии γ -излучением в диапазоне доз 2–8 Гр оценена клonalная выживаемость, уровень микроядер и фокусов белков репарации ДНК γ H2AX и 53BP1. Показано, что клеточная линия HeLa с нокаутом гена *ADAMTS1* характеризуется снижением клonalной выживаемости в 1.9 раз ($p < 0.05$) после облучения в дозе 2 Гр и повышенной частотой микроядер ($55.3 \pm 8.3\%$) по сравнению с исходной клеточной линией HeLa ($36.0 \pm 4.2\%$, $p < 0.05$), но не отличается по уровню фокусов белков репарации ДНК. Трансфекция клеточной линии HeLa с нокаутом *ADAMTS1* плазмидой, несущей кодирующую последовательность изучаемого гена, приводит к снижению частоты радиационно-индуцированных микроядер с 55.3 ± 8.3 до $28.7 \pm 10.3\%$ ($p < 0.05$), что сопоставимо с частотой микроядер в исходной клеточной линии HeLa после облучения ($36.0 \pm 7.2\%$). Полученные данные свидетельствуют об участии *ADAMTS1* в формировании радиационно-индуцированного ответа в данном типе клеток.

Ключевые слова: *ADAMTS1*, HeLa, CRISPR/Cas9, сверхэкспрессия, радиочувствительность.

DOI: 10.31857/S0016675821070122

Воздействие ионизирующего излучения, применяемое в разные периоды противоопухолевой терапии для более чем половины пациентов с онкологическими заболеваниями, является эффективным методом лечения, однако влечет за собой развитие ряда побочных реакций в здоровых тканях организма [1–3]. Спектр данных реакций велик и при одинаковой схеме лечения может варьировать от легких и умеренных до жизнеугрожающих и летальных [4, 5]. Известно, что данные различия обусловлены индивидуальной радиочувствительностью пациентов, в связи с чем, одним из актуальных направлений радиационной онкологии является поиск генетических маркеров, позволя-

ющих предсказать вероятность развития осложнений в нормальных тканях [5, 6]. Выявленный на сегодняшний день полиморфизм некоторых кандидатных генов объясняет лишь небольшую часть популяционной вариативности индивидуальной радиочувствительности, как правило, характерной для определенных видов рака или наследственных синдромов [7–10]. При этом предполагают, что оставшийся генетический вклад в формирование индивидуальной радиочувствительности обеспечивается вариациями в нуклеотидной последовательности множества других генов, распространенных в популяции, но имеющих менее выраженный эффект [5]. Инте-

Таблица 1. Олигонуклеотиды для создания химерных направляющих РНК для гена *ADAMTS1* и анализа введенных мутаций с помощью секвенирования

Олигонуклеотид	Последовательность
ADAMTS1_sgRNA1_F	5'-CACCGGCTTGTGGCAGACCAGTCCGAGTT-3'
ADAMTS1_sgRNA1_R	5'-CTAAAACTCGACTGGTCTGCCACAAGCC-3'
ADAMTS1_sgRNA2_F	5'-CACCGGGTTCCACATAGCGGTGACGTT-3'
ADAMTS1_sgRNA2_R	5'-CTAAAACGTCACCGCTATGTGGAAACCC-3'
ADAMTS1_F	5'-GCCACCGAAAACAACGTGAG-3'
ADAMTS1_R	5'-ACTGGAAGCATAAGAAAGAAGCG-3'

Примечание. Последовательности химерных направляющих РНК выделены полужирным курсивом.

ресно, что наряду с генами, продукты которых связаны с репарацией двунитевых разрывов ДНК, контролем клеточного цикла и метаболизмом ксенобиотиков, с радиочувствительностью связывают и гены, не имеющие прямого отношения к данным процессам и преимущественно обеспечивающие сигнальные функции [11]. Это обстоятельство делает актуальными полногеномные исследования для выявления белков-участников радиационно-индуцированного клеточного ответа [11, 12]. Так, проведенный нами ранее полнотранскриптомный анализ профиля экспрессии генов в лимфоцитах периферической крови здоровых людей показал, что индивиды с различным уровнем фокусов белков репарации ДНК γ H2AX и частотой радиационно-индуцированных микроядер характеризуются дифференциальной экспрессией гена *ADAMTS1* [13]. Данный ген кодирует белок из семейства ADAMTS и содержит несколько функциональных модулей, включая тромбоспондиновый (TS) мотив 1-го типа. Согласно данным литературы, экспрессию данного гена связывают с воспалительными процессами [14, 15], гипоксией [16–18], стимуляцией ангиогенеза [19] и ремоделированием тканей во время развития и прогрессирования рака [20–24], однако роль *ADAMTS1* в онкогенезе неоднозначна, и его повышенная экспрессия ассоциирована как с про-, так и с противоопухолевыми эффектами [20, 21, 25]. Насколько известно, ген *ADAMTS1* не связывают с механизмами формирования индивидуальной радиочувствительности, однако согласно полученным нами ранее данным, клетки здоровых индивидов с низким уровнем микроядер в лимфоцитах периферической крови (как до, так и после облучения *in vitro*) характеризуются повышенной экспрессией *ADAMTS1* [13]. В связи с этим, мы предполагаем, что *ADAMTS1* может быть вовлечен в процесс формирования клеточного ответа на воздействие ионизирующего излучения. Поэтому целью настоящей исследования явился анализ влияния дифференциальной экспрессии гена *ADAMTS1* на формирование радиационно-индуцированного ответа в культуре клеток *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужила радиочувствительная клеточная линия карциномы шейки матки HeLa. Интактную клеточную линию HeLa, а также полученные на ее основе модельные клеточные линии с нокаутом и сверхэкспрессией гена *ADAMTS1* культивировали в среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10%-ной телячьей эмбриональной сыворотки (FBS; Thermo, США) и эритромицина (ПанЭко, Россия) в атмосфере с 5% CO₂ при 37°C.

Создание клеточной линии с нокаутом гена *ADAMTS1*

Клеточная линия HeLa с нокаутом гена *ADAMTS1* была получена путем внесения мутации сдвига рамки считывания с использованием системы редактирования генома CRISPR/Cas9. Химерные направляющие РНК на экзон 2 гена *ADAMTS1* были получены с помощью инструмента sgRNAScorer (<https://crispr.med.harvard.edu/sgRNAScorer/>). Олигонуклеотиды, соответствующие смысловой и антисмысловой цепям химерных направляющих РНК (табл. 1), клонировались в плазмидный вектор с помощью рестриктазы *BsmBI* (NEB, Великобритания).

Трансфекцию двух плазмид с направляющими РНК и плазмиды с генами *Cas9* и *GFP* (Addgene plasmid, 48138) осуществляли с использованием Липофектамина 3000 (Thermo, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Через 24 ч после трансфекции GFP-позитивные клетки отбирали на клеточном сортере FACS ARIA (BD, США) и культивировали в течение двух недель для образования колоний. Анализ присутствия мутаций в сайте редактирования осуществляли с помощью таргетного массового параллельного секвенирования. Амплификацию участков экзона 2 гена *ADAMTS1* проводили с помощью ПЦР с использованием разработанных олигонуклеотидных праймеров (табл. 1). Приготовление библиотек проводили с помощью набора Nextera XT (Illumina, США) в соответствии с протоколом

Таблица 2. Олигонуклеотидные праймеры, использованные для проведения количественной ПЦР в реальном времени

Олигонуклеотид	Последовательность
ADAMTS1-F	5'-ACATGATGGCGTCAATGC-3'
ADAMTS1-R	5'-ATCAAACATTCCTCCCATGACC-3'
ACTB-F	5'-GAGAAGATGACCCAGATCATGTT-3'
ACTB-R	5'-ATAGCACAGCCTGGATAGCAA-3'

производителя. Секвенирование осуществляли на приборе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора MiSeq Reagent Nano Kit v2 kit (Illumina, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Создание клеточной линии со сверхэкспрессией гена ADAMTS1

Создание клеточной линии HeLa со сверхэкспрессией гена *ADAMTS1* осуществляли с помощью временной трансфекции плазмиды ADAMTS1_rCSdest, содержащей кодирующую последовательность изучаемого гена, любезно предоставленной Roger Reeves (Addgene plasmid, 53807) [26]. Трансфекцию осуществляли с помощью Липофектамина 3000 (Thermo, США) по протоколу производителя.

Облучение клеточных линий

Клеточные линии подвергали воздействию ионизирующего γ -излучения ^{60}Co на гамма-терапевтической установке "Theratron Equinox 100" (Best Theratronics, Канада) в дозе 2–8 Гр (для оценки клональной выживаемости на фоне нокаута *ADAMTS1*) и в дозе 2 Гр (для анализа фокусов белков репарации ДНК на фоне нокаута *ADAMTS1* и проведения микроядерного теста в обеих модельных клеточных линиях). Облучение проводили на базе Томского областного онкологического диспансера. Транспортировку клеток осуществляли на льду.

Анализ экспрессии ADAMTS1

Для анализа экспрессии гена *ADAMTS1* РНК из клеточных линий выделяли с использованием реагента "Лира" для выделения РНК, ДНК и белков (Биолабмикс, Россия) по протоколу производителя. Далее полученная РНК была конвертирована в кДНК с использованием набора для обратной транскрипции OT-M-MuLV-RN (Биолабмикс, Россия), после чего проводили ПЦР в реальном времени с помощью набора БиоМастер HS-qPCR (2×) (Биолабмикс, Россия) на амплификаторе AgiMx (Agilent Technologies, США). Для анализа экспрессии изучаемого гена после трансфекции протокол был дополнен этапом обработки РНК с ис-

пользованием фермента ДНКазы и 10× буфера MgCl_2 (Thermo, США) для исключения плазмидной контаминации образцов РНК. Анализ экспрессии осуществляли с использованием разработанных олигонуклеотидных праймеров (табл. 2). В качестве референсного гена для оценки экспрессии использовали ген домашнего хозяйства *ACTB* (табл. 2). Уровень экспрессии каждого целевого гена оценивали относительно уровня экспрессии референсного гена, рассчитывая показатель $\Delta\Delta C_t$ [27].

Клональная выживаемость

После облучения исходной клеточной линии HeLa и клеточной линии с нокаутом *ADAMTS1* определенное число клеток высевали в 6-луночные планшеты (TPP, Швейцария). Для доз 0, 2, 4, 6 и 8 Гр производился посев 1200, 3000, 7500, 30000 и 60000 клеток соответственно. Через 14 дней была проведена фиксация клеток с помощью инкубации в 1 мл раствора метанол-уксусная кислота (3 : 1) в течение 5 мин и окрашивание клеток с использованием красителя Гимза (ПанЭко, Россия) в течение 10 мин. Далее была проведена оценка доли выживших клеток, сформировавших колонии.

Микроядерный тест

Через 24 ч после облучения клетки фиксировали в течение 20 мин при -20°C в растворе метанол-уксусная кислота (3 : 1). После фиксации клетки наносили на предметные стекла и окрашивали красителем DAPI. Частоту микроядер оценивали в 1000 клеток на препарате с помощью микроскопа Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия) с фильтром для DAPI.

Иммуноокрашивание фокусов белков репарации ДНК

Для проведения иммуноокрашивания фокусов белков репарации двунитевых разрывов ДНК клетки HeLa выращивали на покровных стеклах (20 × 20 мм), после чего подвергали воздействию γ -излучения. Через 30 мин, 2, 4, 6, 8 и 24 ч после облучения клетки фиксировали в течение 20 мин при 4°C в растворе 3%-ного параформальдегида

(Sigma, США). После фиксации покровные стекла с клетками инкубировали в 0.2%-ном Triton X-100 (Sigma, США) в течение 10 мин при 4°C, отмывали в трех сменах фосфатного буфера (PBS) по 5 мин и инкубировали в 3%-ном FBS в течение 30 мин при 4°C. Затем на покровные стекла нанесли 100 мкл раствора первичных антител: моноклональных антител мыши к белку γ H2AX (Novus Biologicals, США) и поликлональных антител кролика к белку RAD51 (Novus Biologicals, США), разведенных в 3%-ном FBS (1 : 400). Инкубацию с первичными антителами проводили в течение 1 ч при комнатной температуре, после чего покровные стекла отмывали в трех сменах PBS по 5 мин при комнатной температуре. Затем проводили инкубацию в течение 1 ч при комнатной температуре с раствором вторичных антител: антитела козы к антителам мыши, конъюгированные с родамином, и антитела козы к антителам кролика, конъюгированные с FITC (Novus Biologicals, США), разведенные 1 : 400 в 3%-ном FBS. После трехкратной отмывки в PBS по 5 мин клетки окрашивали DAPI и заключали в среду для микроскопирования Vectashield (Vector Labs, США) на предметных стеклах.

Микрофотографии получали на микроскопе Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия) с автоматической системой анализа препаратов Metafer (Meta-Systems, Германия) с использованием фильтров для DAPI, родамина и FITC. Изображения получали с 15 фокальных плоскостей с шагом 0.5 мкм с последующим слиянием в одно результирующее изображение. Число фокусов белков репарации двунитевых разрывов ДНК анализировали в 150–200 клетках на каждом препарате. Распределение числа фокусов в клетках аппроксимировали с помощью распределения Пуассона, как описано в [28], и в дальнейшем анализе вместо среднего числа фокусов использовали λ из распределения Пуассона.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с использованием программного пакета STATISTICA 8.0 (StatSoft, США). Для сравнений клеточных линий использовали *t*-критерий Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Числовые данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение.

Исследование выполнено с использованием оборудования Центра коллективного пользования “Медицинская геномика” Томского НИМЦ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полученная клеточная линия с нокаутом *ADAMTS1* была компаундной гетерозиготой по двум делециям, которые приводили к сдвигу рам-

ки считывания (рис. 1,а). Анализ потенциальной функциональной значимости введенных мутаций с помощью инструмента Mutation Taster [29] показал, что введенные делеции приводят к значительному укорочению белкового продукта гена *ADAMTS1* в результате преждевременного появления стоп-кодона. Помимо потенциального воздействия на структуру белка, введенные делеции приводили к снижению (в 1.7 раз) экспрессии гена *ADAMTS1* на уровне мРНК (рис. 1,б).

Клеточная линия с нокаутом *ADAMTS1* характеризовалась снижением способности к формированию колоний в 1.9 раз ($p < 0.05$) после воздействия γ -излучением в дозе 2 Гр по сравнению с исходной клеточной линией HeLa (рис. 1,в). Кроме того, нокаут гена *ADAMTS1* приводил к повышению частоты микроядер относительно исходной клеточной линии HeLa (55.3 ± 8.3 и $36.0 \pm 4.2\%$ соответственно, $p < 0.05$) после облучения (рис. 2,з). Однако уровни фокусов белков репарации двунитевых разрывов ДНК γ H2AX и RAD51 после нокаута гена *ADAMTS1* статистически значимо не повышались (рис. 2,д, е).

Анализ экспрессии гена *ADAMTS1* в клеточной линии HeLa после трансфекции показал, что экспрессия данного гена возрастала в 30 раз на фоне трансфекции исходной клеточной линии HeLa и в 32 раза на фоне трансфекции клеточной линии HeLa с нокаутом *ADAMTS1* (рис. 1,б).

Частота микроядер в клеточных линиях после трансфекции не отличалась от таковой в контрольных клеточных линиях до облучения (рис. 1,з), однако статистически значимые различия были выявлены после облучения в дозе 2 Гр. Примечательно, что после трансфекции клеточной линии HeLa с нокаутом *ADAMTS1* частота микроядер снижалась с 55.3 ± 8.3 до $28.7 \pm 10.3\%$ ($p < 0.05$) и не отличалась статистически значимо от исходной клеточной линии HeLa ($36.0 \pm 7.2\%$) (рис. 1,з).

ОБСУЖДЕНИЕ

Статистически значимое снижение клональной выживаемости в клеточной линии с нокаутом *ADAMTS1* относительно исходной клеточной линии HeLa после облучения в дозе 2 Гр свидетельствует о том, что белок, кодируемый данным геном, по-видимому участвует в формировании радиационно-индуцированного клеточного ответа, однако его роль в данном процессе остается неясной. Возможно данный белок вовлечен в процессы контроля клеточного цикла или механизмы клеточной гибели, но не связан с процессами репарации ДНК, поскольку в клеточной линии с нокаутом *ADAMTS1* наблюдается повышение частоты радиационно-индуцированных микроядер, но не фокусов белков репарации ДНК. Связь гена *ADAMTS1* с механизмами контроля клеточного цикла была

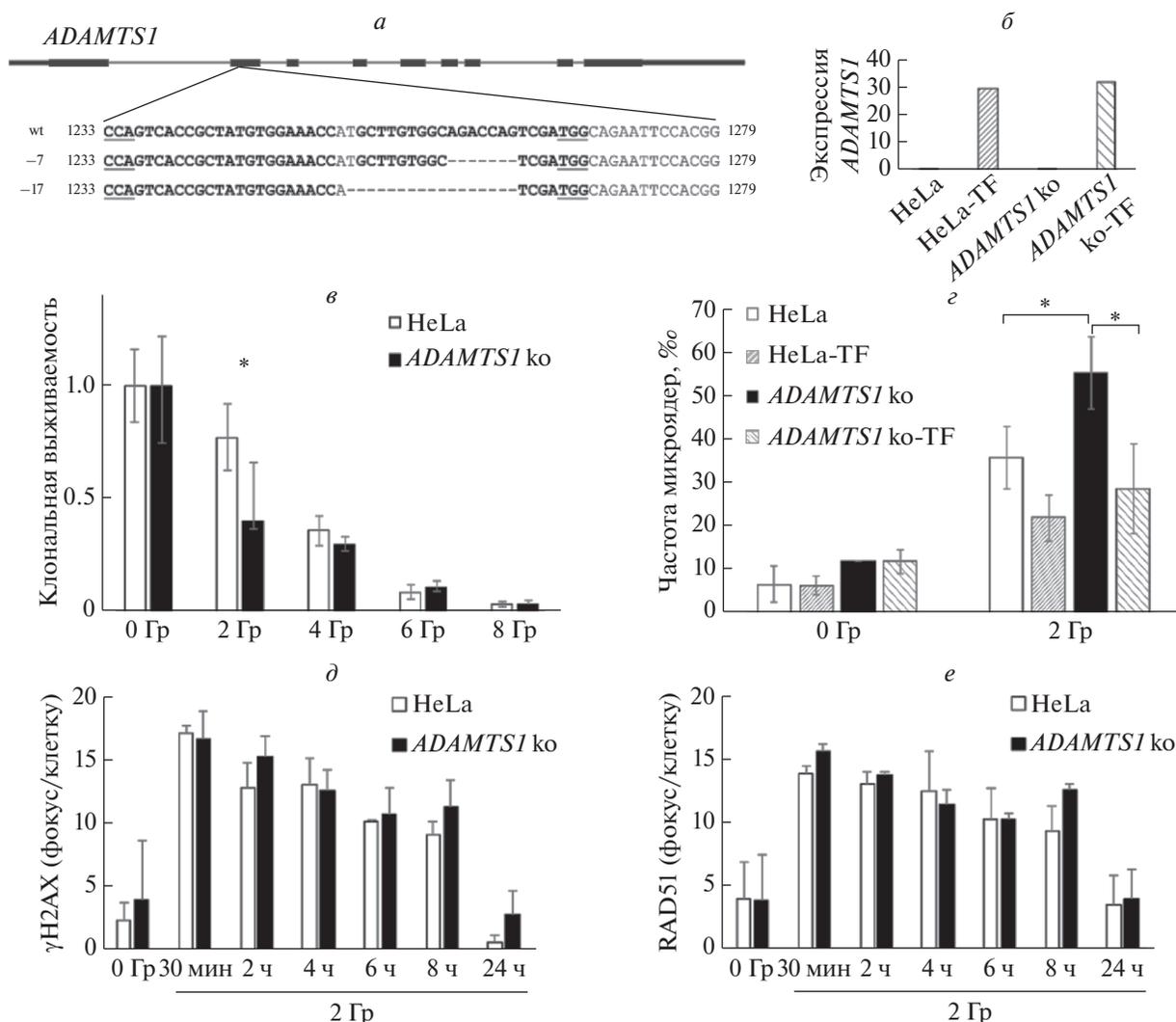


Рис. 1. Эффекты дифференциальной экспрессии гена *ADAMTS1* в клеточной линии HeLa. *ADAMTS1* ko – клеточная линия HeLa с нокаутом *ADAMTS1*, HeLa-TF – клеточная линия HeLa после трансфекции плазмиды, кодирующей *ADAMTS1*, *ADAMTS1* ko-TF – клеточная линия HeLa с нокаутом гена *ADAMTS1* после трансфекции плазмиды, кодирующей *ADAMTS1*. *а* – делеции в экзоне 2 гена *ADAMTS1*, введенные с помощью системы CRISPR/Cas9, wt – референсная последовательность; полужирным начертанием выделены последовательности химерных направляющих РНК, подчеркнуты участки мотива, смежного с протоспейсером (protospacer adjacent motif, PAM); *б* – экспрессия гена *ADAMTS1* в клеточных линиях на фоне нокаута и после трансфекции; *в* – клональная выживаемость после воздействия γ -излучения в дозах 2–8 Гр в клеточной линии с нокаутом гена *ADAMTS1*; *г* – частота микроядер на фоне дифференциальной экспрессии гена *ADAMTS1* после воздействия γ -излучения в дозах 2 Гр; *д*, *е* – динамика уровней фокусов белков γ H2AX (*д*) и RAD51 (*е*) в клеточной линии с нокаутом гена *ADAMTS1* после воздействия γ -излучения в дозах 2 Гр, данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение ($n = 4$), $* p < 0.05$.

отмечена в исследовании М. Ли с соавт. [30]. Было показано, что вызванное активацией микроРНК miR-362-3р снижение экспрессии *ADAMTS1* приводит к аресту клеточного цикла на стадии G1/S и ингибированию пролиферации в культуре гладкомышечных клеток сосудов человека [30].

Согласно данным литературы, металлопротеиназы, участвующие в ремоделировании внеклеточного матрикса, играют ключевую роль в регуляции биодоступности цитокинов и факторов роста [31, 32]. В частности было показано, что металлопро-

теиназа *ADAMTS1* может активировать трансформирующий ростовой фактор β (TGF β) [33, 34]. В то же время известно, что экспрессия гена *ADAMTS1* повышается после ингибирования TGF β [35], что свидетельствует о возможной регуляции *ADAMTS1*-TGF β по механизму отрицательной обратной связи. Это особенно важно, учитывая, что TGF β является важным компонентом ответа клетки на повреждение ДНК [36]. Известно, что нокаут TGF β в клетках мыши или ингибирование сигнального пути TGF β в клетках человека приводит

к нарушению активности и автофосфорилирования белка АТМ, что влечет за собой снижение уровня фосфорилирования его ключевых мишеней, включая белок p53, нарушение активации контрольных точек клеточного цикла и, как следствие, повышенную радиочувствительность клеток [37–39].

Использование системы редактирования генома CRISPR/Cas9 может приводить к внесению нецелевых мутаций в геном объекта исследования, что затрудняет интерпретацию результатов экспериментов [40–44]. В данном исследовании не проводилось полногеномное секвенирование полученной клеточной линии HeLa с нокаутом *ADAMTS1* с целью поиска нежелательных мутаций, внесенных системой CRISPR/Cas9, однако полученная клеточная линия была трансфицирована плазмидой, кодирующей ген *ADAMTS1*. Нормализация фенотипа (снижение частоты микроядер до уровня исходной клеточной линии HeLa) в нокаутной клеточной линии после трансфекции свидетельствует в пользу того, что наблюдаемые эффекты обусловлены непосредственно дифференциальной экспрессией гена *ADAMTS1*, а не потенциально возможными не выявленными мутациями.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об участии *ADAMTS1* в формировании радиационно-индуцированного ответа в клеточной линии HeLa, причем повышенная экспрессия данного гена связана с уменьшением неблагоприятных радиационно-индуцированных эффектов.

В свете активного развития радиогеномики и поиска генов, ассоциированных с формированием радиочувствительности нормальных и опухолевых клеток, представляется целесообразным дальнейшее изучение гена *ADAMTS1* в качестве потенциального биомаркера индивидуальной радиочувствительности.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 19-34-90143 и 16-34-50178.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Foray N., Bourguignon M., Hamada N. Individual response to ionizing radiation // *Mutat Res*. 2016. V. 770. P. 369–386. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.09.001>
2. Rajaraman P., Hauptmann M., Bouffler S. et al. Human individual radiation sensitivity and prospects for prediction // *Annals ICRP*. 2018. V. 47. № 3–4. P. 126–141. <https://doi.org/10.1177/0146645318764091>
3. Seibold P., Auvinen A., Auerbeck D. et al. Clinical and epidemiological observations on individual radiation sensitivity and susceptibility // *Int. J. Radiation Biol.* 2020. V. 96. № 3. P. 324–339. <https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1665209>
4. Ferlazzo M.L., Bourguignon M., Foray N. Functional assays for individual radiosensitivity: a critical review // *Seminars in Radiation Oncology*. WB Saunders. 2017. V. 27. № 4. P. 310–315. <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2017.04.003>
5. Gomolka M., Blyth B., Bourguignon M. et al. Potential screening assays for individual radiation sensitivity and susceptibility and their current validation state // *Int. J. Radiation Biol.* 2020. V. 96. № 3. P. 280–296. <https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1642544>
6. Kirsch D.G., Diehn M., Kesarwala A.H. et al. The future of radiobiology // *J. Natl. Cancer Inst.* 2018. V. 110. № 4. P. 329–340. <https://doi.org/10.1093/jnci/djx231>
7. Barnett G.C., Thompson D., Fachal L. et al. A genome wide association study (GWAS) providing evidence of an association between common genetic variants and late radiotherapy toxicity // *Radiotherapy and Oncology*. 2014. V. 111. № 2. P. 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2014.02.012>
8. Fachal L., Gomez-Caamano A., Barnett G.C. et al. A three-stage genome-wide association study identifies a susceptibility locus for late radiotherapy toxicity at 2q24.1 // *Nat. Genetics*. 2014. V. 46. № 8. P. 891–894. <https://doi.org/10.1038/ng.3020>
9. Talbot C.J., Tanteles G.A., Barnett G.C. et al. A replicated association between polymorphisms near TNF α and risk for adverse reactions to radiotherapy // *Br. J. Cancer*. 2012. V. 107. № 4. P. 748–753. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.290>
10. Seibold P., Behrens S., Schmezer P. et al. XRCC1 polymorphism associated with late toxicity after radiation therapy in breast cancer patients // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2015. V. 92. № 5. P. 1084–1092. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2015.04.011>
11. Andreassen C.N., Schack L.M., Laursen L.V. et al. Radiogenomics—current status, challenges and future directions // *Cancer Letters*. 2016. V. 382. № 1. P. 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.035>
12. Guo Z., Shu Y., Zhou H. et al. Radiogenomics helps to achieve personalized therapy by evaluating patient responses to radiation treatment // *Carcinogenesis*. 2015. V. 36. № 3. P. 307–317. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgv007>
13. Васильев С.А. Особенности спонтанного индуцированного мутагенеза в соматических клетках человека с различным эпигенетическим фоном: Дис. ... д-ра биол. наук. Томск: ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», 2018. 332 с.
14. Rodríguez-Baena F.J., Redondo-García S., Peris-Torres C. et al. ADAMTS1 protease is required for a balanced immune cell repertoire and tumour inflammatory re-

- sponse // *Sci. Reports*. 2018. V. 8. № 1. P. 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31288-7>
15. *Karakose M., Demircan K., Tatal E. et al.* Clinical significance of ADAMTS1, ADAMTS5, ADAMTS9 aggrecanases and IL-17A, IL-23, IL-33 cytokines in polycystic ovary syndrome // *J. Endocrinol. Invest.* 2016. V. 39. № 11. P. 1269–1275. <https://doi.org/10.1007/s40618-016-0472-2>
 16. *Hatipoglu O.F., Hirohata S., Cilek M.Z. et al.* ADAMTS1 is a unique hypoxic early response gene expressed by endothelial cells // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 24. P. 16325–16333. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.001313>
 17. *Tayman M.A., Kurgan S., Onder C. et al.* A disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin-1 (ADAMTS-1) levels in gingival crevicular fluid correlate with vascular endothelial growth factor-A, hypoxia-inducible factor-1 α , and clinical parameters in patients with advanced periodontitis // *J. Periodontol.* 2019. V. 90. № 10. P. 1182–1189. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0195>
 18. *Armutcu F., Demircan K., Yildirim U. et al.* Hypoxia causes important changes of extracellular matrix biomarkers and ADAMTS proteinases in the adriamycin-induced renal fibrosis model // *Nephrology*. 2019. V. 24. № 8. P. 863–875. <https://doi.org/10.1111/nep.13572>
 19. *Kelwick R., Desanlis I., Wheeler G.N. et al.* The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family // *Genome Biology*. 2015. V. 16. № 1. P. 113. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0676-3>
 20. *Wen Y.C., Lin Y.W., Chu C.Y. et al.* Melatonin triggered post-transcriptional and post-translational modifications of ADAMTS1 coordinately retard tumorigenesis and metastasis of renal cell carcinoma // *J. Pineal Res.* 2020. V. 69. № 2. P. e12668. <https://doi.org/10.1111/jpi.12668>
 21. *Ham S.A., Yoo T., Lee W.J. et al.* ADAMTS1-mediated targeting of TSP-1 by PPAR δ suppresses migration and invasion of breast cancer cells // *Oncotarget*. 2017. V. 8. № 55. P. 94091. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21584>
 22. *Cal S., López-Otín C.* ADAMTS proteases and cancer // *Matrix Biology*. 2015. V. 44. P. 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.01.013>
 23. *Rocks N., Paulissen G., El Hour M. et al.* Emerging roles of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in cancer // *Biochimie*. 2008. V. 90. № 2. P. 369–379. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.08.008>
 24. *Lee N.V., Sato M., Annis D.S. et al.* ADAMTS1 mediates the release of antiangiogenic polypeptides from TSP1 and 2 // *The EMBO J.* 2006. V. 25. № 22. P. 5270–5283. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601400>
 25. *Branaccio M., Natale F., Falco T. et al.* Cell-Free DNA Methylation: The new frontiers of pancreatic cancer biomarkers' *Discovery* // *Genes*. 2020. V. 11. № 1. P. 14. <https://doi.org/10.3390/genes11010014>
 26. *Eddie S., Zaghoul N.A., Leitch C.C. et al.* Survey of human chromosome 21 gene expression effects on early development in *Danio rerio* // *G3: Genes, Genomes, Genetics*. 2018. V. 8. № 7. P. 2215–2223. <https://doi.org/10.1534/g3.118.200144>
 27. *Livak K.J., Schmittgen T.D.* Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 $^{-\Delta\Delta CT}$ method // *Methods*. 2001. V. 25. № 4. P. 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
 28. *Martin O.A., Ivashkevich A., Choo S. et al.* Statistical analysis of kinetics, distribution and co-localisation of DNA repair foci in irradiated cells: Cell cycle effect and implications for prediction of radiosensitivity // *DNA Repair (Amst)*. 2013. V. 12. № 10. P. 844–855. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.07.002>
 29. *Schwarz J.M., Cooper D.N., Schuelke M. et al.* MutationTaster2: Mutation prediction for the deep-sequencing age // *Nat. Methods*. 2014. V. 11. № 4. P. 361–362. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2890>
 30. *Li M., Liu Q., Lei J. et al.* MiR-362-3p inhibits the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis by targeting ADAMTS1 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017. V. 493. № 1. P. 270–276. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.09.031>
 31. *Apte S.S.* A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: Functions and mechanisms // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 46. P. 31493–31497. <https://doi.org/10.1074/jbc.R109.052340>
 32. *Egeblad M., Werb Z.* New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression // *Nat. Rev. Cancer*. 2002. V. 2. № 3. P. 161–174. <https://doi.org/10.1038/nrc745>
 33. *Bourd-Boittin K., Bonnier D., Leyme A. et al.* Protease profiling of liver fibrosis reveals the ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1 as a central activator of transforming growth factor beta // *Hepatology*. 2011. V. 54. № 6. P. 2173–2184. <https://doi.org/10.1002/hep.24598>
 34. *Laurent M.A., Bonnier D., Théret N. et al.* *In silico* characterization of the interaction between LSKL peptide, a LAP-TGF-beta derived peptide, and ADAMTS1 // *Comput. Biol. Chem.* 2016. V. 61. P. 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2016.01.012>
 35. *Le Bras G.F., Taylor C., Koumangoye R.B.* TGF β loss activates ADAMTS-1-mediated EGF-dependent invasion in a model of esophageal cell invasion // *Exp. Cell Res.* 2015. V. 330. № 1. P. 29–42. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.07.021>
 36. *Barcellos-Hoff M.H., Cucinotta F.A.* New tricks for an old fox: impact of TGF β on the DNA damage response and genomic stability // *Sci. Signal*. 2014. V. 7. № 341. P. re5. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005474>
 37. *Ewan K.B., Henshall-Powell R.L., Ravani S.A.* Transforming growth factor-beta1 mediates cellular response to DNA damage *in situ* // *Cancer Res.* 2002. V. 62. № 20. P. 5627–5631.
 38. *Kirshner J., Jobling M.F., Pajares M.J. et al.* Inhibition of transforming growth factor-beta1 signaling attenuates ataxia telangiectasia mutated activity in response to genotoxic stress // *Cancer Res.* 2006. V. 66. № 22. P. 10861–10869. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2565>
 39. *Wiegman E.M., Blaese M.A., Loeffler H. et al.* TGFbeta-1 dependent fast stimulation of ATM and p53 phosphorylation following exposure to ionizing radiation

- does not involve TGFbeta-receptor I signalling // *Radiation Oncol.* 2007. V. 83. № 3. P. 289–295.
<https://doi.org/10.1016/j.radonc.2007.05.013>
40. *Fu Y., Foden J.A., Khayter C. et al.* High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells // *Nature Biotechnology.* 2013. V. 31. № 9. P. 822–826.
<https://doi.org/10.1038/nbt.2623>
41. *Pattanayak V., Lin S., Guilinger J. et al.* High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity // *Nature Biotechnology.* 2013. V. 31. № 9. P. 839–843.
<https://doi.org/10.1038/nbt.2673>
42. *Lin Y., Cradick T.J., Brown M.T. et al.* CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences // *Nucl. Ac. Res.* 2014. V. 42. № 11. P. 7473–7485.
<https://doi.org/10.1093/nar/gku402>
43. *Tsai S.Q., Zheng Z., Nguyen N.T. et al.* GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases // *Nature Biotechnology.* 2015. V. 33. № 2. P. 187–197.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3117>
44. *Zischewski J., Fischer R., Bortesi L.* Detection of on-target and off-target mutations generated by CRISPR/Cas9 and other sequence-specific nucleases // *Biotechnology Advances.* 2017. V. 35. № 1. P. 95–104.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.12.003>

Effect of *ADAMTS1* Differential Expression on the Radiation-Induced Response of HeLa Cell Line

R. R. Savchenko^{a, *}, A. A. Murashkina^b, V. S. Fishman^c, E. S. Sukhikh^{d, e}, A. V. Vertinsky^{d, e},
 L. G. Sukhikh^e, O. L. Serov^c, I. N. Lebedev^a, and S. A. Vasilyev^a

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

^bNational Research Tomsk State University, Tomsk, 634050 Russia

^cFederal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

^dTomsk Regional Oncology Center, Tomsk, 634063 Russia

^eNational Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, 634050 Russia

*e-mail: renata.savchenko@medgenetics.ru

The effect of knockout and overexpression of *ADAMTS1* on the radiation-induced response in HeLa cell line was analyzed. The cell line with *ADAMTS1* gene knockout was created using the CRISPR/Cas9 genome editing technology. *ADAMTS1* gene overexpression was ensured by transient transfection of the plasmid containing gene of interest. Clonogenic survival, micronuclei frequency and the γ H2AX and 53BP1 foci level after irradiation with 2–8 Gy of γ -rays were assessed. It was shown that the HeLa cell line with *ADAMTS1* gene knockout is characterized by a 1.9-fold decrease in clonogenic survival after 2 Gy irradiation dose ($p < 0.05$) and an increase in micronuclei frequency ($55.3 \pm 8.3\%$) in comparison with intact HeLa ($36.0 \pm 4.2\%$, $p < 0.05$), but does not differ in the DNA repair foci level. Transfection of plasmid carries the *ADAMTS1* gene into HeLa cell line with *ADAMTS1* gene knockout led to a decrease in the radiation-induced micronuclei frequency from 55.3 ± 8.3 to $28.7 \pm 10.3\%$ ($p < 0.05$), which is comparable to the micronuclei frequency in the original HeLa cell line after irradiation ($36.0 \pm 7.2\%$). Our results indicate that *ADAMTS1* gene are involved in radiation-induced cellular response in HeLa cell line.

Keywords: *ADAMTS1*, HeLa, CRISPR/Cas9, gene overexpression, radiosensitivity.

ОЦЕНКА ЧИСЛА ГЕНОВ, ПОЛИМОРФИЗМ КОТОРЫХ ВЛИЯЕТ НА УРОВЕНЬ НЕЙРОТИЗМА

© 2021 г. Т. И. Аксенович^{1, 2, *}, Н. М. Белоногова¹, И. В. Зоркольева¹, Я. А. Цепилов^{1, 2}

¹Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: aks@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 12.08.2020 г.

После доработки 21.10.2020 г.

Принята к публикации 27.10.2020 г.

Нейротизм — одна из основных личностных характеристик человека, являющаяся важным фактором риска развития психических заболеваний. Интенсивные генетические исследования последних лет позволили сформировать список из примерно 600 генов-кандидатов нейротизма. В этот список вошли как гены, полиморфизм которых непосредственно меняет уровень нейротизма, так и гены, экспрессия которых контролируется генетическими вариантами, лежащими вне гена. Первая группа генов кажется наиболее интересной, поскольку внутригенные сигналы ассоциации легче интерпретировать и для них меньше вероятность ложноположительного результата. В данной работе мы оценили число таких генов в списке из почти 600 известных генов-кандидатов нейротизма, проведя сравнительный анализ результатов двух опубликованных исследований. Мы показали, что 98 из списка известных генов-кандидатов ассоциированы с нейротизмом благодаря своему внутригенному полиморфизму, а 134 — благодаря генетическим вариантам, лежащим вне гена. Для остальных генов мы оценили шанс оказаться в первой группе генов. В итоге, согласно нашим оценкам, только от 153 до 198 генов из почти 600 известных генов-кандидатов нейротизма могут влиять на признак благодаря своему внутригенному полиморфизму. Таким образом, на примере нейротизма мы впервые показали, что только для 25–33% генов, идентифицированных общепринятыми методами, контроль признака обеспечивается внутригенным полиморфизмом. Эта оценка позволяет предсказать эффективность полноэкзомного секвенирования для увеличения мощности анализа ассоциаций.

Ключевые слова: нейротизм, анализ ассоциаций на геномном уровне, внутригенный полиморфизм, позиционное картирование, анализ e-QTL.

DOI: 10.31857/S001667582107002X

Нейротизм является одной из основных личностных характеристик человека [1]. Люди с высокими показателями нейротизма характеризуются эмоциональной нестабильностью, возбудимостью, тревожностью, неуверенностью в себе. Генетика нейротизма уже давно привлекает внимание исследователей, поскольку этот признак относительно стабилен [2], обладает высокой наследуемостью [3] и является важным фактором риска развития психических расстройств [4, 5]. Высокая генетическая корреляция между уровнем нейротизма и психическим здоровьем [6–8] позволяет предположить, что изучение генетического контроля нейротизма может помочь понять генетическую архитектуру психических расстройств [9].

До недавнего времени было известно всего несколько потенциальных генов-кандидатов нейротизма. Однако в последние годы был достигнут

огромный прогресс в этой области. В наиболее масштабной работе путем метаанализа трех выборок (UK Biobank study, $n = 372903$; 23andMe, $n = 59206$ и Genetics of Personality Consortium, $n = 17375$), включающих в сумме 449484 человека, было идентифицировано 170 независимых однонуклеотидных полиморфных вариантов (ОМП), ассоциированных с нейротизмом, и предложен список из 599 генов, предположительно влияющих на нейротизм [10]. Этот список был сформирован с помощью нескольких методов и в него вошли гены, которые могли участвовать в контроле признака благодаря внутригенному полиморфизму (первая категория), или ОМП, лежащим вне гена и меняющим его экспрессию (вторая категория). Первая категория генов является более интересной. Внутригенный полиморфизм может модифицировать структуру кодируемых белков благодаря

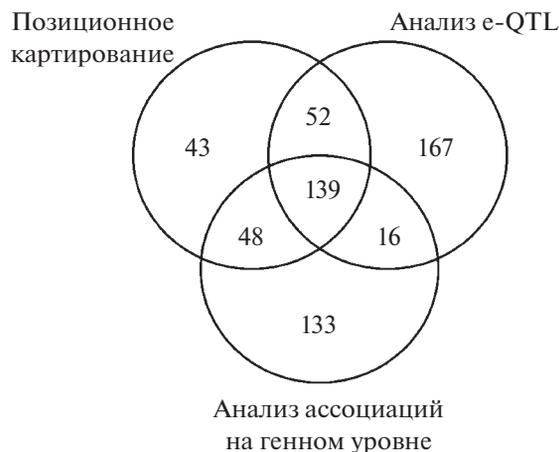


Рис. 1. Диаграмма, иллюстрирующая комбинацию методов, с помощью которых был сформирован список из 598 генов-кандидатов нейротизма в работе [10].

замене аминокислот или альтернативному сплайсингу. Полиморфизм некодирующих внутригенных регионов может регулировать транскрипцию и трансляцию этих генов, формирование белковых комплексов или посттрансляционные модификации [11, 12]. В итоге, внутригенные сигналы ассоциации более интерпретабельны, чем межгенные. В целом, около 85% известных клинически значимых генетических вариантов большого эффекта находятся именно в кодирующих последовательностях или сайтах сплайсинга — с этим связано появление и популярность полноэкзомного секвенирования, в особенности для поиска редких генетических вариантов [13, 14]. Известно также, что вероятность получения ложноположительного результата в поиске ассоциаций существенно зависит от априорной вероятности того, что тестируемый генетический вариант действительно влияет на признак [15]. Судя по имеющимся данным [13, 14], для внутригенных вариантов априорная вероятность выше, и, следовательно, шанс получить ложно-положительный результат значительно ниже, чем при анализе межгенных вариантов.

Подавляющее большинство (598 из 599) генов нейротизма, предложенных в работе [10], было идентифицировано с помощью трех методов (рис. 1), каждый из которых не позволяет однозначно отнести найденный ген к одной из двух перечисленных категорий. Позиционное картирование и анализ e-QTL базируются на результатах полногеномного анализа ассоциаций (ПГАА), с помощью которого можно идентифицировать ОНП, независимо ассоциированные с признаком. При позиционном картировании ОНП приписывается к гену, если он лежит внутри него или отстоит от него не далее, чем на 10 тысяч пар оснований [10]. Очевидно, что из-за неравновесия по сцеплению нельзя однозначно отнести найденный та-

ким образом ген к одной из категорий, руководствуясь только положением ОНП относительно гена. При анализе e-QTL проверяется, есть ли разница в экспрессии какого-либо гена у носителей разных аллелей ОНП. В большинстве случаев такой ОНП лежит вне гена, однако иногда он находится внутри него. Наиболее адекватным методом поиска ассоциаций признака с внутригенными вариантами является полногеномный анализ ассоциаций на генном уровне (gene-based association analysis). Суть этого метода заключается в одновременном анализе всех генетических вариантов, лежащих внутри гена [16]. Благодаря этому в анализ вовлекаются редкие генетические варианты, потенциально обладающие большим эффектом на признак. Преимуществами этого метода являются не только увеличение мощности, но и прямое указание на ген, ассоциированный с признаком. Однако недавно нами было показано, что для примерно половины таких генов ассоциация с признаком объясняется неравновесием по сцеплению с ОНП вне гена, дающими сильные сигналы ассоциации [17]. В этой работе был предложен метод, названный polygene pruning, который позволил разделить сигналы, полученные с помощью анализа ассоциаций на генном уровне на те, которые обусловлены внутригенным полиморфизмом, и те, которые наведены ОНП, лежащими вне гена и находящимися в неравновесии по сцеплению с внутригенными ОНП.

К сожалению предложенный метод нельзя применить ко всем генам из списка 599 генов нейротизма, так как индивидуальные данные о фенотипах и генотипах членов выборки не находятся в открытом доступе, так же как и результаты метаанализа трех выборок, поскольку он использует материал базы данных 23andMe, для которого запрещена публикация результатов ПГАА. Однако результаты ПГАА, полученные в работе [10]

Таблица 1. Анализ групп генов, включенных в список генов-кандидатов нейротизма благодаря результатам, полученным различными методами

	GB + PM + e-QTL*	GB + PM	GB + e-QTL	GB	PM + e-QTL	PM	e-QTL	Всего
Первая категория**	48	23	1	18	5	3	0	98
Вторая категория	63	15	4	23	17	8	4	134
Доля первой категории ($m \pm se$)	0.43 ± 0.08	0.61 ± 0.14	0.2 ± 0.2	0.44 ± 0.08	0.23 ± 0.11	0.27 ± 0.13	0 ± 0.01	
Прочие	28	10	11	92	30	32	163	366
Всего	139	48	16	133	52	43	167	598

Примечание. * – GB (gene-based association analysis) – анализ ассоциаций на геномном уровне, PM (positional mapping) – позиционное картирование, e-QTL – анализ e-QTL; ** – первая категория включает гены, полиморфизм которых ассоциирован с нейротизмом, вторая категория включает гены, ассоциированные с нейротизмом благодаря неравновесию по сцеплению с ОНП вне гена.

на выборке из UK Biobank study ($n = 380\,506$), были опубликованы и позволили нам повторно провести анализ ассоциаций на геномном уровне, используя специально разработанные методы [18], и протестировать, обусловлен ли сигнал ассоциации внутригеновым полиморфизмом [17].

В данной работе мы сопоставили результаты, полученные в двух исследованиях [10] и [17], для того, чтобы оценить долю генов, ассоциированных с нейротизмом благодаря собственному полиморфизму, среди 598 генов нейротизма, предложенных в работе [10].

Материалом для данного исследования послужил список 598 генов с указанием методов их идентификации и p -value, полученных при анализе ассоциаций на геномном уровне (дополнительная табл. 15 из работы [10]), а также списки генов, полученные в работе [17] с использованием всех ОНП внутри гена до и после процедуры polygene pruning (https://zenodo.org/record/3888340#.X3fX-7u1S_IU) и дополнительная табл. 1 из работы [17]). Рассматривали только гены с p -value $< 2.7 \times 10^{-6}$.

Прежде всего мы сравнили результаты полногеномного анализа ассоциаций на геномном уровне, полученные для одних и тех же генов в работах [10] и [17] и показали, что коэффициент корреляции между логарифмами p -value достаточно высок ($r = 0.78$, $n = 225$). Это позволяет нам использовать результаты, полученные в работе [17] для детализации результатов, описанных в статье [10].

Затем мы сравнили списки генов из работ [10] и [17]. Оказалось, что 98 генов, успешно прошедших процедуру polygene pruning в работе [17] – присутствуют в списке из 598 известных генов-кандидатов. Эти гены продемонстрировали ассоциацию с нейротизмом благодаря внутригеновому полиморфизму, то есть относятся к первой категории. Еще 134 гена, не прошедшие процедуру polygene pruning в работе [17], также оказались в списке из 598 известных генов-кандидатов. Ассоциация этих

генов с нейротизмом была обусловлена ОНП, лежащими за пределами гена. Эти гены относятся ко второй категории. Списки генов, отнесенных нами к первой и второй категориям, свободно доступны по адресу (https://zenodo.org/record/4063652#.X3cEuWIS_IU).

Для остальных 366 генов-кандидатов, идентифицированных в работе [10], мы не располагали достаточной информацией для отнесения их к какой-либо категории. Для этих генов мы попытались оценить шансы попасть в первую категорию, используя информацию о том, с помощью каких методов были идентифицированы эти гены. Мы разбили полный список из 598 генов-кандидатов нейротизма, предложенный в работе [10] на семь частей в зависимости от комбинации методов, используемых для составления этого списка, в соответствии с рис. 1. Для каждой части мы подсчитали число генов, отнесенных нами к первой и второй категориям. В качестве оценки шанса генов попасть в первую категорию мы использовали отношение числа генов первой категории к сумме генов первой и второй категорий. Полученные результаты приведены в табл. 1.

Как видно, наибольший шанс попасть в первую категорию наблюдается у генов, включенных в список генов-кандидатов по результатам анализа ассоциаций на геномном уровне. В среднем он составляет 0.46. Для генов, не показавших сигнала ассоциации на геномном уровне, но включенных в список по результатам позиционного картирования, шанс попасть в первую категорию ниже, в среднем он составляет 0.24. Самый низкий шанс у генов, попавших в список только благодаря анализу e-QTL.

Используя полученные оценки, мы подсчитали, что среднее число генов, предположительно относящихся к первой категории, среди генов, пока не отнесенных ни к одной из категорий, равно 76.3. С учетом 95%-го доверительного интервала

минимальная оценка числа таких генов равна 55.01, а максимальная — 99.47. Учитывая, что 98 генов из списка генов-кандидатов уже были включены в первую категорию, можно заключить, что только от 153 (25%) до 198 (33%) генов из 598 генов-кандидатов нейротизма могут влиять на признак благодаря своему внутригенному полиморфизму.

Таким образом, мы впервые оценили долю генов, идентифицированных общепринятыми методами, для которых контроль признака обеспечивается внутригенным полиморфизмом. Для нейротизма она составила от 25 до 33%. Это означает, что мощность анализа ассоциаций значительной части генов не увеличится при использовании результатов секвенирования экзома. Кроме того, мы составили список из 98 генов-кандидатов нейротизма, внутригенный полиморфизм которых наиболее вероятно контролирует уровень этого признака. Таким образом, нам удалось конкретизировать накопленную информацию о генетике нейротизма, что может способствовать лучшему пониманию генетической архитектуры этого признака.

Работа поддержана грантом РФФИ (20-04-00464), бюджетным проектом Института цитологии и генетики (0324-2019-0040-С-01/АААА-А17-117092070032-4) и программой “5-100 лучших университетов” Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Widiger T.A.* Neuroticism // *Handbook of Individual Differences in Social Behavior*. N.Y.: Guilford Press, 2009. P. 129–146.
2. *Matthews G., Deary I., Whiteman M.* *Personality Traits*. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2009. 602 p.
3. *Vukasovic T., Bratko D.* Heritability of personality: A meta-analysis of behavior genetic studies // *Psychol. Bull.* 2015. V. 141. № 4. P. 769–785. <https://doi.org/10.1037/bul0000017>
4. *Hettema J.M., Neale M.C., Myers J.M. et al.* A population-based twin study of the relationship between neuroticism and internalizing disorders // *Am. J. Psychiatry*. 2006. V. 163. № 5. P. 857–864. <https://doi.org/10.1176/ajp.2006.163.5.857>
5. *Kendler K.S., Myers J.* The genetic and environmental relationship between major depression and the five-factor model of personality // *Psychol. Med.* 2010. V. 40. № 5. P. 801–806. <https://doi.org/10.1017/S0033291709991140>
6. *Adams M.J., Howard D.M., Luciano M. et al.* Genetic stratification of depression by neuroticism: revisiting a diagnostic tradition // *Psychol. Med.* 2019. V. 50. № 15. P. 2526–2535. <https://doi.org/10.1017/S0033291719002629>
7. *Luciano M., Hagenaars S.P., Davies G. et al.* Association analysis in over 329000 individuals identifies 116 independent variants influencing neuroticism // *Nat. Genet.* 2018. V. 50. № 1. P. 6–11. <https://doi.org/10.1038/s41588-017-0013-8>
8. *Ohi K., Otiwa T., Shimada M. et al.* Shared genetic etiology between anxiety disorders and psychiatric and related intermediate phenotypes // *Psychol. Med.* 2020. V. 50. № 4. P. 692–704. <https://doi.org/10.1017/S003329171900059X>
9. *Goldstein B.L., Klein D.N.* A review of selected candidate endophenotypes for depression // *Clin. Psychol. Rev.* 2014. V. 34. № 5. P. 417–427. <https://doi.org/10.1016/j.cpr.2014.06.003>
10. *Nagel M., Jansen P. R., Stringer S. et al.* Meta-analysis of genome-wide association studies for neuroticism in 449484 individuals identifies novel genetic loci and pathways // *Nat. Genet.* 2018. V. 50. № 7. P. 920–927. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0151-7>
11. *Leppek K., Das R., Barna M.* Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018. V. 19. № 3. P. 158–174. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.103>
12. *Mayr C.* What are 3' UTRs doing? // *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* 2019. V. 11. № 10. P. a034728. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034728>
13. *Choi M., Scholl U.I., Ji W. et al.* Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing // *PNAS*. 2009. V. 106. № 45. P. 19096–19101. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910672106>
14. *LaDuca H., Farwell K.D., Vuong H. et al.* Exome sequencing covers >98% of mutations identified on targeted next generation sequencing panels // *PLoS One*. 2017. V. 12. № 2. P. e0170843. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170843>
15. *Wacholder S., Chanock S., Garcia-Closas M. et al.* Assessing the probability that a positive report is false: An approach for molecular epidemiology studies // *J. Natl. Cancer Inst.* 2004. V. 96. № 6. P. 434–442. <https://doi.org/10.1093/jnci/djh075>
16. *Li B., Leal S.M.* Methods for detecting associations with rare variants for common diseases: Application to analysis of sequence data // *Am. J. Hum. Genet.* 2008. V. 83. № 3. P. 311–321. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.06.024>
17. *Belonogova N.M., Zorkoltseva I.V., Tsepilov Y.A., Axenovich T.I.* Gene-based association analysis identified 190 genes with polymorphisms affecting neuroticism // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. № 1. P. 2484. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82123-5>
18. *Svishcheva G.R., Belonogova N.M., Zorkoltseva I.V. et al.* Gene-based association tests using GWAS summary statistics // *Bioinformatics*. 2019. V. 35. № 19. P. 3701–3708. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz172>

Number of Genes Associated with Neuroticism Due to Their Polymorphisms

T. I. Axenovich^{a, b, *}, N. M. Belonogova^a, I. V. Zorkoltseva^a, and Ya. A. Tsepilov^{a, b}

^a*Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

^b*Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia*

**e-mail: aks@bionet.nsc.ru*

Neuroticism is a personality trait, which is an important risk factor for psychiatric disorders. Recent genome-wide studies have reported about 600 genes potentially influencing neuroticism. This list consists of both genes whose polymorphisms directly regulate the level of neuroticism and genes whose expression is controlled by genetic variants outside the gene. The first group of genes is more interesting because within-gene association signals are usually easy to interpret and less probable to be false-positives. We analyzed and compared the results of two published studies to estimate the number of such genes in the list of neuroticism genes. We demonstrated that 98 known genes were associated with neuroticism due to their polymorphisms and 134 genes due to the genetic variants outside the gene. For the remaining genes, we estimated chance to be in the first group. As a result, according to our estimates, only from 153 to 198 genes of almost 600 known neuroticism genes affect the trait due to their within-gene polymorphisms. Thus, using neuroticism as an example, we demonstrated that only 25–33% of the genes identified by the widely used methods control trait by the within-gene variation. This estimation predicts the effectiveness of the whole exome sequencing to increase the power of association analysis.

Keywords: neuroticism, gene-based association analysis, within-gene polymorphisms, positional mapping, e-QTL analysis.