

СОДЕРЖАНИЕ

Том 58, номер 9, 2022

Обзорные и теоретические статьи

Методологии выделения древней ДНК из костной ткани для геномного анализа: подходы и практические рекомендации

Т. В. Андреева, А. Б. Малярчук, А. Д. Сошкина,
Н. А. Дудко, М. Ю. Плотникова, Е. И. Рогов

979

Генетика микроорганизмов

Гены *MSMEG_1963* и *MSMEG_5597*, но не *inhA*, регулируют устойчивость *Mycobacterium smegmatis* к триптантринам

С. Г. Фролова, В. Н. Даниленко, Д. А. Маслов

999

Видоформирующий *PFNA*-оперон бифидобактерий: модули сенсорных белков Pkb2 и FN3, структура и распределение среди разных видов и штаммов бифидобактерий в микробиоме кишечника человека

В. Н. Даниленко, М. Г. Алексеева, Т. А. Кошенко, А. С. Ковтун, В. З. Незаметдинова

1008

Микробиом кишечника человека – резервуар аминогликозид-N-ацетилтрансфераз – генов лекарственной устойчивости

М. Г. Алексеева, Н. В. Захаревич, А. В. Ратькин, В. Н. Даниленко

1021

Сравнительный геномный, транскриптомный и протеомный анализ штамма *Limosilactobacillus fermentum* U-21, перспективного для создания фармабиотика

Е. У. Полуэктова, Д. А. Мавлетова, М. В. Одорская, М. В. Марсова,
К. М. Климина, Т. А. Кошенко, Р. А. Юнес, В. Н. Даниленко

1029

Генетика животных

Ареал, насекомые-переносчики и полиморфизм митохондриальной ДНК гамазового клеща *Noploseius oblongus* (Mesostigmata, Blattisociidae) – облигатного микобионта трутового гриба *Fomitopsis pinicola* (Polyporales, Basidiomycota)

Б. В. Андрианов, О. Л. Макарова, И. И. Горячева, А. Г. Зуев

1042

О генетической структуре популяций *Harmonia axyridis* (Coleoptera, Coccinellidae) в нативном и инвазивном ареалах – взгляд с позиций молекулярной генетики

И. И. Горячева, Д. М. Щенетов, А. В. Блехман, И. А. Захаров

1056

Генетика человека

Вариант rs7579411 гена *LHCGR* ассоциирован с развитием гиперплазии эндометрия

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

1068

Индивидуальные вариации длины теломера у здоровых индивидов: эффект полиморфного варианта гена *TERT* и урбанизации

А. В. Казанцева, Ю. Д. Давыдова, Р. Ф. Еникеева, Р. Н. Мустафин,
М. М. Лобаскова, С. Б. Малых, Э. К. Хуснутдинова

1074

Анализ мутаций гена *ATL1* и клинических особенностей течения заболевания у пациентов с наследственной спастической параплегией

И. М. Хидиятова, Е. В. Сайфуллина, А. С. Карунас, А. Ф. Ахметгалеева,
Р. Ф. Кутлубаева, Л. А. Смакова, С. Л. Лобов, А. В. Поляков, О. А. Шагина,
В. А. Кадникова, О. П. Рыжкова, Р. В. Магжанов, Э. К. Хуснутдинова

1085

Краткие сообщения

Связь полиморфных маркеров генов *TP53*, *MDM2* и *CDKN1A* с риском развития рака яичника

П. К. Бреннер, М. А. Капралова, Д. С. Ходырев, С. В. Хохлова, Г. Н. Хабас,
А. В. Асатурова, Ю. В. Носова, Л. Н. Каюмова, Т. М. Заварыкина

1094

Contents

Vol. 58, No. 9, 2022

Reviews and Theoretical Articles

Methodologies of Ancient DNA Extraction from Bones for Genomic Analysis: Approaches and Practical Recommendations

*T. V. Andreeva, A. B. Malyarchuk, A. D. Soshkina,
N. A. Dudko, M. Yu. Plotnikova, and E. I. Rogav*

979

Genetics of Microorganisms

MSMEG_1963 and *MSMEG_5597* Genes, but Not *inhA*, Modulate *Mycobacterium smegmatis* Resistance to Tryptanthrins

S. G. Frolova, V. N. Danilenko, and D. A. Maslov

999

Species-Forming *PFNA* Operon in Bifidobacteria: Modules of Sensor Proteins Pkb2 and FN3, Structure and Distribution among Different Species and Strains of Bifidobacteria Derived from the Human Intestinal Microbiome

V. N. Danilenko, M. G. Alekseeva, T. A. Koshenko, A. S. Kovtun, and V. Z. Nezametdinova

1008

Human Intestinal Microbiome – A Reservoir of Aminoglycoside-N-Acetyl Transferases – Drug Resistance Genes

M. G. Alekseeva, N. V. Zakharevich, A. V. Ratkin, and V. N. Danilenko

1021

Comparative Genomic, Transcriptomic, and Proteomic Analysis of the *Limosilactobacillus fermentum* U-21 Strain, Promising for the Creation of a Pharmabiotic

*E. U. Poluektova, D. A. Mavletova, M. V. Odorskaya, M. V. Marsova,
K. M. Klimina, T. A. Koshenko, R. A. Yunes, and V. N. Danilenko*

1029

Animal Genetics

The Area, Transmitting Insects and Mitochondrial DNA Polymorphism of the Gamasid Mite *Hoploseius oblongus* (Mesostigmata, Blattisociidae), the Obligate Mycobiont on the Bracket Fungus *Fomitopsis pinicola* (Polyporales, Basidiomycota)

B. V. Andrianov, O. L. Makarova, I. I. Goryacheva, and A. G. Zuev

1042

The Genetic Structure of *Harmonia axyridis* (Coleoptera, Coccinellidae) Populations from Native and Invasive Ranges from a Position of the Molecular Genetics

I. I. Goryacheva, D. M. Schepetov, A. V. Blekhan, and I. A. Zakharov

1056

Human Genetics

Polymorphism rs7579411 of the *LHCGR* Gene is Associated with the Development of Endometrial Hyperplasia

I. V. Ponomarenko, I. V. Batlutskaya, V. S. Orlova, O. A. Efremova, and M. I. Churnosov

1068

Individual Differences in Relative Telomere Length in Mentally Healthy Subjects: The Effect of *TERT* Gene Polymorphism and Urban Residency

*A. V. Kazantseva, Yu. D. Davydova, R. F. Enikeeva, R. N. Mustafin,
M. M. Lobaskova, S. B. Malykh, and E. K. Khusnutdinova*

1074

Analysis of *ATL1* Gene Mutations and Clinical Features of the Disease Course in Patients with Hereditary Spastic Paraplegia

*I. M. Khidiyatova, E. V. Saifullina, A. S. Karunas, A. F. Akhmetgaleyeva, R. F. Kutlubaeva,
L. A. Smakova, S. L. Lobov, A. V. Polyakov, O. A. Shchagina, V. A. Kadnikova,
O. P. Ryzhkova, R. V. Magzhanov, and E. K. Khusnutdinova*

1085

Short Communications

Association of Polymorphic Markers of the *TP53*, *MDM2*, and *CDKN1A* Genes with the Risk of Ovarian Cancer

*P. K. Brenner, M. A. Kapralova, D. S. Khodyrev, S. V. Khokhlova, G. N. Khabas,
A. V. Asaturova, Yu. V. Nosova, L. N. Kayumova, and T. M. Zavarykina*

1094

МЕТОДОЛОГИИ ВЫДЕЛЕНИЯ ДРЕВНЕЙ ДНК ИЗ КОСТНОЙ ТКАНИ ДЛЯ ГЕНОМНОГО АНАЛИЗА: ПОДХОДЫ И ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

© 2022 г. Т. В. Андреева^{1, 2, 3, *}, А. Б. Малярчук¹, А. Д. Сошкина¹, Н. А. Дудко^{1, 3},
М. Ю. Плотникова³, Е. И. Рогаев^{3, 4, 5, **}

¹Центр генетики и генетических технологий, Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

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

³Центр генетики и наук о жизни, Университет “Сириус”, Сочи, 354340 Россия

⁴Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

⁵Медицинская школа Чан Массачусетского университета, департамент психиатрии, Шрусбери, 01545 США

*e-mail: andreeva@rogaevlab.ru

**e-mail: rogaev@vigg.ru

Поступила в редакцию 01.04.2022 г.

После доработки 28.04.2022 г.

Принята к публикации 29.04.2022 г.

Появление и развитие методов масштабного параллельного секвенирования открыло новые перспективы в области изучения древних, в том числе вымерших организмов. Многочисленные костные останки, представленные в археологических и музейных коллекциях, зачастую являются единственными источниками информации о древних видах и популяциях. В обзоре обсуждаются особенности костной ткани человека и связанные с ними преимущества и недостатки использования костного материала как источника ДНК для проведения геномного анализа древних людей. Представлены новые методологические подходы к выделению ДНК из древних костных останков человека и ее подготовке к масштабному параллельному секвенированию, а также перспективы и направления дальнейших исследований в новой междисциплинарной области – палеогеномике.

Ключевые слова: древняя ДНК, палеогенетика, костные останки, масштабное параллельное секвенирование.

DOI: 10.31857/S001667582209003X

Выделение и анализ ДНК из древних археологических и палеонтологических находок стало возможно не так давно, первые эксперименты были проведены в 80-х гг. XX в., а первая работа по выделению древней ДНК из бедренной кости, датированной XVII в. [1], открыла невероятные перспективы в новой области исследований – палеогенетике. Древняя ДНК является уникальным источником новых знаний об эволюции, популяционной истории, палеопатологии древних видов, популяций и народов. По проведенным ранее оценкам ДНК, пригодная для анализа, не может сохраняться в древних останках более 10–100 тыс. лет [2, 3], при этом ядерная ДНК деградирует примерно в 2 раза быстрее, чем митохондриальная [4]. Эти расчеты были сделаны для ДНК размером 400–800 пн в начале 90-х гг. прошлого века, когда анализ древней ДНК проводили с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенирования по методу Сенгера, для применения ко-

торых требовались достаточно длинные фрагменты ДНК. Более короткие фрагменты, очевидно, могут сохраняться дольше, но только недавно, с появлением новых технологий секвенирования открылась возможность исследовать такие очень короткие молекулы ДНК (от 20–25 пн), а также были разработаны подходы, позволяющие реконструировать и анализировать молекулы ДНК, представленные в биологических материалах в виде одноцепочечных фрагментов, в том числе претерпевших различные химические модификации, включая постмортальные.

В настоящее время возраст самого древнего палеонтологического образца – шерстистого мамонта, из бивня которого была успешно выделена и проанализирована геномная ДНК, оценивают в более чем один миллион лет [5]. Следует, однако, учитывать, что рассчитанный молекулярный возраст животного (1.65 млн лет) может не соответствовать действительному возрасту останков. Ка-

либровку молекулярного возраста авторы этой работы проводили относительно образцов мамонтов, возраст которых был определен радиоуглеродным методом. Поскольку в настоящее время максимальный абсолютный возраст, который может быть определен с помощью радиоуглеродного метода, составляет не более 55 тыс. лет [6], погрешность молекулярных датировок для всех более древних объектов может быть достаточно высокой.

Значительная часть публикаций по древней ДНК посвящена исследованию останков человека, поэтому в настоящем обзоре сделан акцент на результаты исследования костных останков человека и рассмотрены методы анализа, применимые к ним. Изучение древней ДНК человека, а не животных, связано с одной критически важной проблемой — исследователи должны быть уверены в аутентичности древней ДНК, т.е. в том, что ДНК получена непосредственно из древнего образца, а не выделена из материала, попавшего в образец в результате контаминации (загрязнения), которая может произойти во время раскопок, при хранении археологических образцов и музейных экспонатов, а также при выделении и анализе ДНК. Поэтому при работе с древней ДНК человека необходимо учитывать высокий риск такой контаминации и предпринимать все возможные меры, в том числе представленные в настоящем обзоре, для ее минимизации, своевременного выявления и учета при проведении генетического анализа.

Костная ткань (кости и зубы) — важный источник биологического материала для генетических исследований в криминалистике и в палеогенетике. Благодаря физико-химическим особенностям костной ткани клетки и содержащаяся в них ДНК защищены от разрушающего влияния окружающей среды, а фрагменты костей и зубов часто являются единственным источником древнего биологического материала, доступным для исследования. Возможность выделения и анализа ДНК из древних костных останков была показана более 30 лет назад [1, 7]. С тех пор произошел значительный прогресс в этой новой области исследования, были разработаны многочисленные методы и подходы для работы с древней ДНК, исследование которой существенно обогатило наши знания о процессах, происходивших в прошлом как в жизни людей, так и всего живого мира.

ОСОБЕННОСТИ ДРЕВНЕЙ ДНК

Древняя ДНК, извлеченная из живых организмов, живших много лет назад, имеет ряд специфических особенностей. В живой клетке спонтанные повреждения ДНК исправляются (репарируются) специальными ферментативными системами. После смерти организма клеточные механизмы репарации перестают работать, тогда как химические изменения ДНК продолжают происходить в

результате воздействия факторов окружающей среды и компонентов самой клетки. Это ведет к накоплению химических модификаций и постепенному расщеплению молекул ДНК. Для древней ДНК характерны несколько типов постмортальных изменений, среди них наиболее значимыми являются фрагментация и укорочение молекул ДНК, химические модификации нуклеотидов и образование сшивок между молекулами ДНК и с другими соединениями.

Самая частая причина нарушения в структуре ДНК, не только древней, — гидролиз азотистых оснований. Легче всего происходит гидролиз пуриновых оснований — апуринизация (рис. 1,а). Реакция бета-элиминации, которая следует за гидролизом, приводит к одноцепочечным разрывам в молекуле ДНК. Наиболее часто именно пурины представлены в начале последовательности ДНК при геномном секвенировании, что подтверждает разрыв фрагментов ДНК непосредственно по сайтам апуринизации [8]. Гидролитическое дезаминирование азотистых оснований — еще одна химическая модификация ДНК. Цитозин в результате потери аминогруппы превращается в урацил, метил-цитозин — в тимин (рис. 1,б). Таким образом, при анализе участка ДНК с дезаминированным цитозином с использованием полимеразной реакции в комплементарную цепь встраивается аденин, и новый синтезированный фрагмент ДНК содержит мутацию С>Т по одной цепи и G>A по комплементарной. Примечательно, что уровень дезаминирования цитозина в двуцепочечной ДНК существенно ниже (в 140 раз), чем в одноцепочечной ДНК [9], таким образом, одноцепочечные разрывы и фрагментация древней ДНК способствуют повышению уровня замен С>Т в древней ДНК в целом. Более того, это соответствует наблюдаемому увеличению числа замен С>Т на концах ДНК-фрагментов [8] — они часто представлены одноцепочечными участками (так называемыми “липкими” концами).

Некоторые модификации древней ДНК блокируют движение ДНК-полимеразы по матрице и соответственно делают невозможным ее амплификацию и секвенирование. К таким модификациям в первую очередь относятся внутри- и межмолекулярные сшивки между цепями ДНК, возникающие в результате реакции алкилирования (рис. 1,в), а также сшивки ДНК с белками в результате реакции Майяра (реакция конденсации между сахаром сахарофосфатного остова ДНК и аминогруппой азотистого основания или аминокислоты). К группе модификаций, затрудняющих анализ древней ДНК в связи с блокировкой движения полимеразы, также относится ряд химических модификаций нуклеотидов [10] (рис. 1,г). Следует отметить, что хотя такие модификации, препятствующие работе ДНК-полимеразы, были выявлены в древней

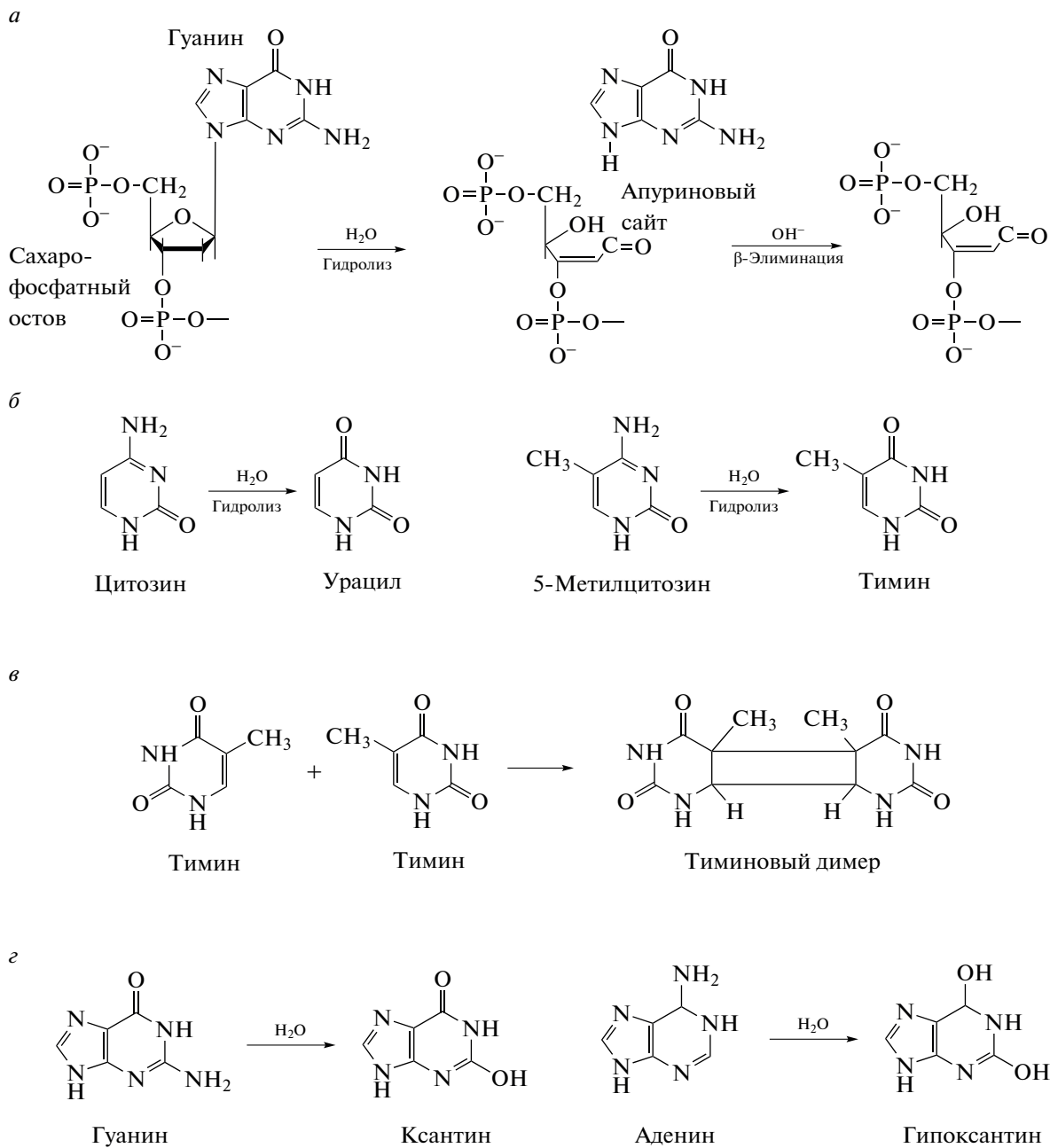


Рис. 1. Химические модификации древней ДНК. *a* – разрыв N-гликозидной связи между сахаром сахаро-фосфатного остова и азотистым основанием приводит к образованию апуринового или апиридинового сайта, и далее разрыв цепи ДНК в результате реакции β -элиминации; *b* – дезаминирование цитозина и метилцитозина приводит к образованию урацила и тимина соответственно. ДНК-полимераза при синтезе второй цепи встраивает аденин комплементарно урацилу и тимину, что приводит к возникновению специфичных для древней ДНК мутаций С>Т (или G>А в комплементарной цепи ДНК); *в* – образование тиминовых димеров в результате реакции алкилирования двух тиминов, которые могут располагаться как на одной цепи ДНК, так и на разных. Сшивки между цепями ДНК препятствуют продвижению ДНК-полимеразы по матрице, что затрудняет проведение анализа с использованием реакций амплификации и секвенирования; *г* – модификации нуклеотидов, блокирующие работу полимеразы, присутствуют в древней ДНК в меньших количествах.

ДНК, экспериментальные исследования показали, что они составляют небольшую долю от всех модификаций древней ДНК [11], а наиболее распространенными изменениями ДНК, которые играют ключевую роль в исследовании древней ДНК, яв-

ляются дезаминирование цитозина, приводящее к заменам С>Т, и высокая степень фрагментации ДНК – средняя длина фрагментов древней ДНК, доступных для анализа, как правило составляет менее 100 пн.

СТРУКТУРА КОСТИ И СОХРАННОСТЬ ДНК

Костные клетки (остеобласты, остециты и остеокласты), являющиеся источником ДНК в костях, составляют всего лишь 2% костной ткани, тогда как значительная часть кости образована межклеточным матриксом, в котором 70% и более представлено неорганическими соединениями, преимущественно нерастворимыми кристаллами гидроксиапатитов кальция (общая формула $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), фосфатом кальция $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ и в небольшом количестве карбонатом кальция (CaCO_3). Основной органический компонент межклеточного матрикса – коллаген. Несмотря на крайне малое содержание клеточных компонентов, а следовательно и ДНК в костной ткани, зачастую только костные останки, которые сохраняются длительное время, могут быть доступны для палеогенетических и геномных исследований.

Дегградация костных тканей после смерти организма (диагенез) обусловлена двумя ключевыми процессами. Первый происходит с участием микроорганизмов [12, 13] и протекает относительно быстро, особенно если останки находятся в аэробной среде, где оказываются легко доступны для разложения с участием микроорганизмов (бактерий и грибов). Второй процесс связан с химической дегградацией компонентов кости и протекает значительно медленнее. Химическая дегградация ДНК в клетках костной ткани в процессе диагенеза костей преимущественно связана с гидролизом пуринов (апуринизацией), а наиболее важными факторами, влияющими на скорость апуринизации, являются температура, влажность и pH. Постмортальные модификации ДНК накапливаются с возрастом археологического биологического образца, однако скорость их появления находится в прямой зависимости от условий, в которых находится соответствующий образец. В результате этого сохранность древнего костного материала может быть лучше, чем у более молодых объектов, а значит качество ДНК, которая может быть выделена из археологического материала, не всегда напрямую связано с его возрастом. Чем больше воды может проникнуть внутрь костей через поры, присутствующие в костях или образующиеся в процессе диагенеза, тем выше скорость дегградации как самой кости, так и содержащейся в ней ДНК. Таким образом, размер пор, имеющихся в костях или возникающих в процессе их дегградации, оказывает существенное влияние на проникновение воды внутрь костной ткани [14], а следовательно на сохранность в ней ДНК: пористая структура губчатых костей способствует быстрой дегградации ДНК, плотные непористые кости менее подвержены дегградации благодаря тому, что вода плохо в них проникает. Кроме того, в плотной костной ткани содержится больше кристаллов гидроксиапатита, чем в губчатой. Связанная с

гидроксиапатитом ДНК в 1000 раз более устойчива к расщеплению ДНКазы, чем свободная [15]; также было показано, что уровень апуринизации ДНК, связанной с гидроксиапатитом, ниже, чем свободной ДНК [2]. Гидроксиапатит связывает не только ДНК, но и ДНКазы, снижая таким образом их экзонуклеазную активность [16, 17]. Все вместе это дополнительно способствует лучшей сохранности ДНК в плотных костных тканях, чем в пористых губчатых.

Степень сохранности ДНК в кости является ключевым параметром при исследовании древнего костного материала. Зачастую при исследовании особо ценных археологических или музейных образцов важно до выделения ДНК и соответствующего разрушения кости или зуба определить возможное наличие в образце ДНК, предсказать ее количество и оценить перспективность ее использования для генетического анализа. Ряд работ посвящен попыткам исследовать связь структуры и степени сохранности костного материала с содержанием в нем ДНК (например, [18]), а также разработке простых методов такой оценки, аналогичных, например, подходу, предложенному для анализа мягких тканей [19]. Так, в качестве маркеров сохранности ДНК в кости рассматривают степень диагенеза кости, характеризующуюся изменением соотношения органической и неорганической фракций [20, 21] и сохранностью белков [18, 22], а также гистологическое состояние кости [23]. Также показано, что ДНК лучше сохраняется внутри коллагеновых фибрилл, а учитывая тот факт, что в целом ДНК является менее стабильным органическим соединением, чем белки, было высказано предположение, что костные останки, в которых не сохранилась белковая фракция, являются плохим источником древней ДНК [18]. Это предположение, однако, остается спорным – при исследовании серии костей из вечной мерзлоты не было выявлено связи между содержанием в них ДНК и коллагена [21]. В целом в настоящее время отсутствуют эффективные общепринятые методы предварительной оценки сохранности ДНК в костном материале, в большинстве случаев такая оценка может быть сделана только по результатам уже проведенного генетического анализа.

Была показана значимая корреляция сохранности костей и ДНК и температурного режима, в котором находились костные останки, – ДНК практически не удается выделить из древних образцов, найденных в теплых регионах [24], исключением являются египетские мумии, прошедшие специальную обработку, замедляющую процесс разложения тканей [25–27]. Температура оказывает прямое влияние на скорость апуринизации ДНК и, таким образом, является ключевым фактором дегградации ДНК (помимо расщепления ферментами клетки и микроорганизмами). Со-

гласно эмпирическим оценкам, при температуре -5°C ДНК может сохраняться до 6.8 млн лет, а ожидаемая длина фрагментов ДНК через 10 тыс. лет будет составлять более 650 пн. При температуре 25°C максимальный срок присутствия следов ДНК в образце составляет 22 тыс. лет, при этом уже спустя 10 тыс лет средняя длина сохранившихся фрагментов оценивается в 2 пн [4]. Удивительно, но в целом ряде работ было показано, что непродолжительное воздействие экстремально высоких температур (например, в результате сжигания останков или тепловой обработки для приема в пищу) не только не приводит к полной деградации ДНК [28–30], но может даже способствовать лучшему сохранению ДНК, предположительно за счет инактивации клеточных нуклеаз при повышении температуры [31]. Более того, некоторые авторы предлагают нагревать кости перед процедурой выделения ДНК [32, 33].

Отдельно следует отметить, что количество ДНК и ее сохранность зависят не только от условий, в которых находился биологический объект после своей смерти. Процедуры извлечения костного материала из археологического памятника, его последующая обработка и хранение в составе археологических и музейных коллекций вносят значительный вклад в качество ДНК, которая может быть извлечена из костного фрагмента. Было показано, что в ряде случаев потери ДНК за короткий период хранения костей в составе таких коллекций могут быть сопоставимы с потерями за время, прошедшее с момента смерти индивида (несколько тысяч лет) [34]. Эти данные показывают необходимость разработки и внедрения в практику проведения полевых археологических исследований новых правил и требований, препятствующих потерям ДНК.

В целом пористые губчатые кости оказываются наиболее разрушенными со временем под воздействием внешних факторов и соответственно практически непригодными для выделения ДНК и проведения генетического анализа (за рядом исключений, см. ниже). Наибольший выход эндогенной ДНК может быть получен при использовании наиболее плотных костей организма человека.

КАКИЕ КОСТИ СКЕЛЕТА ЧЕЛОВЕКА НАИБОЛЕЕ ПРИГОДНЫ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ДРЕВНЕЙ ДНК?

Зубы являются одним из самых распространенных объектов для исследований древней ДНК благодаря устойчивости их тканей к воздействию окружающей среды. Основную массу зуба составляет дентин — разновидность костной ткани, главным компонентом которой (60%) является гидроксиапатит [35]. Верхняя часть зуба покрыта защитным слоем эмали, нижняя — цементом.

Эмаль, покрывающая зуб, считается самым твердым веществом в человеческом организме, это ее свойство обеспечивает дополнительную защиту ДНК внутри зуба от воздействия внешней среды [36].

Внутренняя часть зуба — пульпа — представляет собой рыхлую волокнистую соединительную ткань и содержит наибольшее число клеток по сравнению с другими тканями зуба, следовательно она является наилучшим источником ДНК [37]. Однако таким свойством обладает только пульпа живого здорового зуба. В процессе жизни индивида, в том числе при поражении зубов болезнями, а также в результате постмортальной деградации зуба, состояние пульпы ухудшается [38, 39]. В некоторых случаях пульпа может подвергаться постмортальной мумификации и длительное время сохраняться в таком состоянии, являясь хорошим источником ДНК, но в большинстве случаев происходит ее полная деградация [39]. Тем не менее благодаря тому, что пульпа зуба включает в себя нервные клетки, а также кровеносные и лимфатические сосуды, по которым патогенные микроорганизмы могут попадать в зуб и быть там обнаружены, пульпа может быть использована как источник ДНК древних патогенов, например возбудителя лепры *Mycobacterium leprae* [40].

Твердые ткани зуба (дентин, эмаль и цемент) менее подвержены деградации со временем, поэтому ДНК в них сохраняется лучше. Эмаль состоит преимущественно из неорганических соединений (до 97%) и содержит относительно небольшое количество ДНК, что делает ее не самым лучшим объектом для выделения древней ДНК [41]. Основную часть зуба составляет дентин, который считается одним из лучших источников древней ДНК. Было показано, что содержание ядерной ДНК во внутренних частях дентина уменьшается с возрастом индивида [38], что, вероятно, связано с деградацией прилегающей к этим слоям пульпы, однако дентин все равно наиболее часто используется для проведения генетического анализа древних костных останков (например, [42–45], в том числе останков архаичных людей — денисовцев [46]). Содержание мтДНК еще в одной ткани зуба — цементе — в несколько раз выше, чем в дентине [47]. В отличие от дентина количество ядерных клеток в апикальном слое цемента не уменьшается с возрастом [41], а ДНК, выделенная из цемента зуба, характеризуется более высоким содержанием эндогенной ядерной ДНК по сравнению с дентином [48]. Таким образом, цемент, по-видимому, является лучшим источником ДНК из древних зубов, чем дентин. Тем не менее его использование в палеогеномных исследованиях может быть затруднено — несмотря на высокое содержание ДНК, количество цемента в одном зубе крайне мало, толщина цементного слоя зуба составляет всего лишь 20–50 мкм, достигая 150–200 мкм в апексе корня [49]. К другим про-



Рис. 2. Примеры костных объектов, характеризующихся наибольшим количеством древней ДНК: зуб из средневекового захоронения с территории Самарской области (а); слуховые косточки (молоточек, стремечко, наковальня) из захоронения скифского времени с территории Воронежской области (б); фрагмент височной кости с наружным слуховым проходом из захоронения черняховской культуры с территории Одесской области Украины – плотная каменистая кость в области внутреннего уха является одним из лучших источников древней эндогенной ДНК (в).

блемам, связанным с использованием цемента, можно отнести высокий уровень поверхностного загрязнения, а также сложности с отделением цементной ткани от зуба. Так, например, наиболее эффективный способ получения цемента предполагает удаление коронки зуба с последующей очисткой внутренней части зуба от пульпы и дентина [48].

Среди других костей тела человека наилучшим источником древней ДНК является каменистая кость – часть височной кости (рис. 2, в), которая считается самой плотной костью у млекопитающих [50]. Сравнительный анализ показал, что количество эндогенной ДНК в цементе зуба сопоставимо с ее количеством в каменистой кости, а в каменистой кости плохо сохранившихся древних образцов оно даже выше, чем в цементе [51]. Следует отметить, что наблюдаются существенные различия в количестве ДНК, которая выделяется из разных частей каменистой кости. Так, количество эндогенной ДНК в плотной костной ткани внутри слуховой капсулы в десятки и даже сотни раз выше, чем в плотной части, окружающей внутреннее ухо, и губчатой части височной кости [52]. Плотные участки височной кости, включая улитку, рассматриваются в настоящее время как наиболее перспективный источник древней ДНК, в связи с чем даже разработаны стандартизованные методы извлечения этих участков из височных костей скелета человека [53].

Недавно в качестве альтернативного источника эндогенной древней ДНК были предложены слуховые косточки (молоточек, стремечко и наковальня, рис. 2, б). Было показано, в том числе в наших собственных исследованиях, что их использование позволяет получить древнюю ДНК сопоставимого с участками каменистой кости качества [54]. Способы извлечения слуховых косточек из черепа представляют собой менее разрушительные для скелета процедуры, чем выпиливание каменистой кости, а структура внутреннего уха может служить источником важной морфологической информации (см, например, [54, 55]); таким образом, использование плотных фрагментов височной кости, извлечение которых требует значительных вмешательств в структуру черепа и изменений его целостности, может быть недопустимо при исследовании уникальных особо ценных древних антропологических объектов.

Помимо наиболее плотных тканей скелета человека в качестве источника древней ДНК используют целый ряд других костей, включая ребра и ключицу, трубчатые кости (плюсны, пястные кости, дистальные фаланги кисти рук, бедренную кость), седалищный бугорок седалищной кости, таранную кость (см. обзор [56]), плечевую кость [57], фрагменты ребер [58], угол нижней челюсти (результаты генетической экспертизы останков императора Николая II Романова [59]). Следует отдельно отметить, что древние костные останки являются перспективным материалом не только для исследования эндогенной ДНК, но и для изучения древних патогенов. Такая ДНК лучше всего сохраняется в васкуляризированных участках костей, именно они с большей вероятностью подвергаются воздействию патогенов, которые пере-

носятся током крови при жизни человека [60]. Поэтому именно такие костные ткани (включая пульпу зуба, ключицу, таранную кость) являются лучшим объектом для поиска и исследования древних патогенов человека, что следует учитывать при планировании экспериментов.

В пилотных работах, связанных с исследованием древних костей, ДНК извлекали из достаточно большого количества кости — до нескольких граммов [1]. По мере совершенствования методов выделения ДНК и последующего генетического анализа все меньшее количество костного материала требуется для проведения работ. В среднем 50–300 мг очищенной от загрязнения кости достаточно для выделения ДНК и проведения геномного анализа. Минимальное количество костной ткани, которое к настоящему времени было использовано для выделения древней ДНК, составляет 9.4 мг [61]. Однако ожидаемое геномное покрытие, которое потенциально может быть достигнуто при использовании такого количества костного порошка (в данном случае оно было оценено авторами в $\times 2.39$), недостаточно для реконструкции полной геномной последовательности и проведения полногеномного анализа не только из-за малого количества ДНК в столь малом костном образце, но и в связи с потенциально высоким уровнем контаминации любых древних образцов, оценить который можно только по результатам проведенного генетического анализа. Поэтому минимизация размера костных фрагментов, используемых для выделения ДНК, всегда должна коррелировать с возможностью получения достаточного для анализа количества эндогенной ДНК. Также необходимо отметить, что исследования древней ДНК требуют проведения нескольких повторных независимых экспериментов, в том числе независимых экстракций ДНК из одного и того же биологического образца, что также следует учитывать при выборе количества материала для анализа ДНК [62].

Кости и зубы из археологических памятников представляют собой ограниченный ресурс и являются частью культурного наследия человечества, поэтому каждый эксперимент должен быть тщательно спланирован, в том числе с этической точки зрения [63]. Целесообразность разрушающего анализа, а также выбор костного материала для него должны проводиться в рамках совместных междисциплинарных исследований генетиков, археологов и антропологов.

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ КОСТЕЙ

Процесс выделения ДНК из любого костного материала, как правило, включает в себя три основных этапа: измельчение кости, растворение ткани с высвобождением ДНК в раствор и, нако-

нец, очистку ДНК от белков и других компонентов клетки (табл. 1). При работе с древней ДНК важным этапом является очистка (деконтаминация) археологического образца от внешних загрязнений. Основными задачами, которые стоят перед исследователями при выделении ДНК из древних костных останков, являются получение максимального количества ДНК из небольшого доступного для анализа фрагмента кости, минимизация повреждений ДНК в процессе выделения и удаление возможных ингибиторов, способных помешать последующим ферментативным реакциям, в которых будет использоваться выделенная ДНК. Следует отметить, что ранние исследования древней ДНК, в рамках которых и были разработаны базовые методические подходы, представленные ниже, были ориентированы преимущественно на получение большого количества ДНК с длиной фрагментов, пригодной для ПЦР-амплификации и последующего секвенирования по методу Сенгера и/или проведения анализа STR-маркеров. В связи с развитием в последние годы методологии масштабного параллельного секвенирования требования к качеству и количеству ДНК, необходимой для геномного анализа, претерпели существенные изменения — появилась возможность использовать для анализа малые количества очень коротких фрагментов ДНК, поэтому разработанные ранее методы выделения ДНК в настоящее время корректируются в соответствии с новыми методами геномного анализа.

Деконтаминация

Одна из главных проблем, с которыми приходится сталкиваться при анализе древней эндогенной ДНК, — ее контаминация (загрязнение) чужеродными фрагментами ДНК, преимущественно из окружающей среды (экзогенной ДНК), содержание которых в древних образцах может значительно превышать содержание эндогенных фрагментов. В ряде случаев эндогенная ДНК может составлять менее 1% от всей получаемой из образца ДНК. Для снижения риска загрязнения современной ДНК все работы с древними образцами проводят в специальных помещениях, изолированных от современного биологического материала, с соблюдением целого ряда условий и правил [62]. Кроме того, перед непосредственной процедурой выделения ДНК из кости проводят деконтаминацию, которая заключается в первую очередь в очистке костных останков от загрязнений, попавших из окружающей среды, и поэтому сконцентрированных преимущественно на поверхности кости. После первоначальной отмывки кости или зуба в стерильной воде и удаления остатков мягких тканей и загрязнений дальнейший процесс деконтаминации проводят различными способами (табл. 1). Наиболее эффективным является

Таблица 1. Обзор методов и растворов, используемых для выделения ДНК из древних костных останков

Реагент или способ	Механизм действия	Примечание, ссылка на примеры использования	
1-й этап – деконтаминация			
Стерильная вода	Очистка поверхности костного материала от остатков мягких тканей и внешних загрязнений	Альтернативный способ – высверливание костного порошка из внутренних незагрязненных участков кости	
Удаление поверхностного слоя кости			
Гипохлорит натрия (NaClO)			[64]
Щелочь (0.1 Н NaOH)			[7]
Уксусная кислота			[65]
Соляная кислота			[58]
Этиловый спирт (70%)			[58]
Фосфатный буфер (50 мМ NaH ₂ PO ₄ , pH 7.5, 25 мМ Tris, pH 8.0, 50 мМ NaCl)			[58]
Перекись водорода			[66]
УФ-облучение			[67]
2-й этап – измельчение костной ткани			
Измельчение в жидком азоте	Увеличение поверхности соприкосновения растворов с костной тканью	[1, 68]	
Высверливание с помощью дрели и сверла		[43]	
Измельчение в шаровой мельнице или ее аналогах		[69]	
Экстракция ДНК без разрушения кости	Сохранение внешней целостности костных останков	[70–72]	
3-й этап – декальцинирование и лизис костной ткани			
ЭДТА (0.45–0.5 М раствор)	Растворение солей кальция, хелатирование ионов кальция и магния для инактивации клеточных ферментов (нуклеаз)	[73]	
ЭГТА (0.5 М раствор)	Растворение солей кальция, хелатирование ионов кальция	[45]	
Фосфатный буфер (50 мМ NaH ₂ PO ₄ , pH 7.5, 25 мМ Tris, pH 8.0, 50 мМ NaCl)	Фосфат вытесняет ДНК из минерального матрикса кости	[74]	
Натрий-солевой буфер (100 мМ Tris, pH 8.0, 500 мМ NaCl, 10 мМ EDTA, pH 8.0)		[74]	
Соляная кислота (1 Н раствор)	Растворение минеральных компонентов клетки	[7]	
Буфер на основе гуанидинтиоционата натрия (GuSCN), например, 5 М GuSCN, 50 мМ Tris, pH 8.0, 25 мМ NaCl, 20 мМ EDTA	Вытесняет ДНК из минерального матрикса кости	[70, 75, 76]	

Таблица 1. Окончание

Реагент или способ	Механизм действия	Примечание, ссылка на примеры использования
Дополнительные компоненты в составе лизирующих и декальцинирующих растворов		
Протеиназа К (20 мг/мл)	Расщепление белкового компонента кости	Рекомендуется в большинстве протоколов выделения ДНК
Поверхностно-активные вещества (например, лаурилсаркозил натрия, додецилсульфат натрия, Тритон X-100, поливинилпирролидон, Твин-20 и др.)	Диссоциация клеток и их компонентов	[74–78]
Дитиотриетол (DTT)	Удаление дисульфидных мостиков для высвобождения ДНК из белковой фракции	[79]
N-Фенацилтиазиолиум бромид (РТВ)	Разрушение связей между сахарами ДНК и аминокислотами белковой фракции кости	[70]
4-й этап – очистка ДНК		
Фенол-хлороформный метод	Классический метод очистки ДНК от белковой фракции	[80]
С использованием силики (в растворе или на колонках)	Связывание молекул ДНК	[74, 81, 82]
Преципитация спиртами (изопропанолом)	Осаждение ДНК из раствора	[83, 84]

механическое удаление верхнего самого загрязненного слоя кости, например, путем шлифовки [85–87] или взятие для анализа только материала из внутренних частей кости или зуба [88]. Кроме механической очистки кости предлагают обрабатывать различными деконтаминирующими растворами. Наиболее широко используемый и эффективный среди них – раствор гипохлорита натрия [64]. Также в литературе представлены успешные результаты выделения ДНК из костей после их очистки с помощью 30%-ной уксусной кислоты [65], 15%-ной соляной кислоты, 70%-ного этилового спирта [58], перекиси водорода [66]. УФ-облучение кости или костного порошка тоже может применяться для деконтаминации [67].

Наряду с описанными выше стандартными методами очистки костных образцов недавно были предложены дополнительные подходы, позволяющие получить значительно более высокий выход эндогенной ДНК. Они основаны на обработке уже измельченной кости или зуба (костного порошка) растворами ЭДТА (этилендиаминтетраацетата натрия), фосфатным буфером или раствором гипохлорита натрия [89] (табл. 1). Фосфатный буфер способствует высвобождению ДНК, связанной на поверхности кости, в раствор. Исследования показали, что удаление ДНК с поверхности

костей фосфатным буфером может уменьшить количество бактериальных фрагментов в выделенной ДНК в среднем на 64% [90]. В то же время он малоэффективен для очистки от загрязнения древнего костного образца человеком, в первую очередь современным, в таких случаях рекомендуют использовать обработку костного порошка гипохлоритом натрия. Раствор гипохлорита натрия окисляет органические компоненты кости, приводя к образованию неорганических кристаллических агрегатов, в которых лучше сохраняется эндогенная ДНК [91, 92]. Для предотвращения еще большей деградации ДНК, которая может происходить при взаимодействии ее с гипохлоритом натрия, требуется подбор оптимальной концентрации гипохлорита натрия и времени его воздействия на костный порошок [93, 94].

Подготовка образца к лизису – измельчение костной ткани

Для эффективного проникновения декальцинирующего лизирующего раствора в костную ткань требуется измельчение кости до состояния костной муки (костного порошка). Стандартными методами получения костного порошка являются растирание кости в жидком азоте [1, 68], из-

мельчение с помощью шаровой мельницы или высверливание материала с помощью дрели и сверла [69]. Сравнительный анализ показал, что использование дрели в 30 раз снижает выход мтДНК по сравнению с другими способами измельчения кости. Такой эффект, вероятно, связан с температурной деградацией ДНК, которая происходит за счет высокой скорости вращения сверла и связанного с этим повышения температуры образца [43]. В то же время использование сверла является менее разрушающим методом извлечения материала и позволяет сохранить значительную часть кости в первоначальном виде. Использование шаровой мельницы требует разрушения костного фрагмента большего размера, при этом измельчение происходит в более щадящих условиях, чем с использованием дрели, — без нагрева образца и соответствующей деградации ДНК.

Следует отдельно отметить, что материал археологических памятников, используемый для проведения генетического анализа, является, как правило, уникальным и может представлять археологическую, культурную или даже художественную ценность. В связи с этим актуальным является вопрос о разработке методов анализа древней ДНК без разрушения археологического объекта (кости). Некоторыми исследователями предложен ряд способов такого выделения. Так, например, сравнительный анализ трех различных буферов (основанных на растворах GuSCN , Tris/NaCl и фосфатного буфера) для экстракции ДНК из костей и зубов без их разрушения показал возможность получения митохондриальной ДНК при использовании всех трех растворов. При этом только при использовании буфера с GuSCN авторам работы [70] удалось амплифицировать фрагменты не только митохондриальной ДНК, но и ядерной. Также было показано, что использование 0.5 М раствора ЭДТА с протеиназой К без предварительного измельчения костей и зубов дает возможность анализировать не только митохондриальную, но и геномную ДНК [71]. Примечательно, что для выделения ДНК не обязательно инкубировать весь зуб в соответствующем растворе. Экстракция ДНК путем погружения в раствор корня зуба (при этом возможна защита парафиллом других корней зуба от растворения) может быть перспективным неразрушающим методом выделения ДНК. По некоторым оценкам содержание эндогенных молекул ДНК и степень контаминации ДНК, выделенной таким способом из цемента зуба, могут быть сопоставимы с образцами, выделенными из каменистой кости [72]. Некоторые авторы отмечают, что даже повторное проведение неразрушающей процедуры экстракции древней ДНК (до 5 раз) из одного и того же зуба позволяет получить пригодную для генетического анализа ДНК [70, 71]. Очевидно, что при этом происходят химические модификации тканей зуба, однако сохраняется возможность про-

водить на том же образце морфологические и биохимические исследования, например радиоуглеродную датировку [61].

При использовании подобных методов выделения ДНК без разрушения и измельчения костного образца следует ожидать высокий уровень контаминации эндогенной ДНК в связи с тем, что используемые для инкубации костей растворы способствуют экстракции ДНК преимущественно из поверхностных, наиболее загрязненных другими организмами и бактериями участков ДНК. Удивительно, но это предположение не подтвердилось при выделении ДНК из цемента зуба — предположительно плотная структура цемента защищает его от проникновения внутрь ткани внешних загрязнений [70, 71]. Таким образом, подобные неразрушающие методы могут быть полезны при исследовании уникальных объектов, например из музейных коллекций, разрушение которых недопустимо.

Лизис костной ткани

Следующим этапом выделения ДНК из костей является инкубация костного порошка в различных растворах для лизиса костной ткани и высвобождения ДНК (табл. 1). Наиболее часто для декальцинирования кости используют раствор 0.45–0.5 М ЭДТА, а расщепление белковой фракции костной ткани проводят, как правило, с использованием протеиназы К. В качестве дополнительных компонентов, способствующих лучшему высвобождению ДНК из кости в раствор, успешно применяют различные поверхностно-активные вещества, например лаурилсаркозил натрия [77], додецилсульфат натрия [74], Тритон X-100 [75, 76], поливинилпирролидон [76, 78], Твин-20 [95] и другие. Для удаления дисульфидных мостиков может использоваться диэтилтиотриетол (ДТТ) [79], для удаления сшивок ДНК с белками, возникших в результате реакций гликозилирования, применяют РТВ (*N*-phenacylthiazolium bromide) [70]. Лизис костной ткани, как правило, проводят в течение ночи при температуре 55–56°C, однако предлагаются и более длительные инкубации (до нескольких суток). Следует заметить, что длительная инкубация при высокой температуре может приводить к еще большей фрагментации древней ДНК, поэтому при проведении долгой инкубации следует использовать более низкую температуру — 37°C или даже комнатную.

ЭДТА, входящая в состав большинства растворов для лизиса костной ткани, выполняет две ключевые задачи: во-первых, переводит кальций, который входит в состав кости, в растворимое состояние, а во-вторых, являясь хелатирующим агентом, инактивирует ДНКазы, связывая катионы магния и кальция, необходимые для их работы. До сих пор среди исследователей нет единого

мнения о необходимости полного растворения кальция на этапе обработки костного порошка ЭДТА. С одной стороны, предлагается проведение полной деминерализации кости перед экстракцией ДНК [73], с другой — целый ряд работ свидетельствует о том, что возможно эффективное выделение древней ДНК из кости без полного растворения костного материала. В нескольких работах было показано, что из нерастворившегося костного порошка может быть выделена дополнительная ДНК после повторной инкубации осадка с новой порцией ЭДТА [96–98].

Интересные результаты были получены в экспериментах по исследованию процессов взаимодействия ДНК с гидроксиапатитом — основным компонентом кости. Было показано, что максимальное количество связанной с гидроксиапатитом ДНК высвобождается после кратковременной (от 15 мин до 2 ч) обработки материала раствором ЭДТА, инкубация длительностью более 4 ч позволяет получить значительно меньшее количество ДНК, а спустя 7 ч от начала инкубации ДНК совсем не детектируется в растворе. Предполагают, что при длительной инкубации происходит повторное связывание ДНК с гидроксиапатитом после насыщения раствора комплексами Ca–ЭДТА [17].

ЭДТА — не единственный агент, который может быть использован для декальцинирования костного материала. В одной из первых работ по выделению ДНК из древних костей их декальцинирование проводили с помощью концентрированной соляной кислоты [7]. Для этих же целей потенциально могут быть использованы ЭГТА (EGTA, ethylene-glycol-ether-diaminetetra-acetic acid), СДТА (1,2 cyclohexane-diaminetetra-acetic acid), лимонная кислота [99]. Эксперименты, проведенные на зубах, показали, что ЭГТА эффективнее, чем ЭДТА, растворяет кальций из дентина при терапии зубных каналов в стоматологии за счет более быстрого по сравнению с ЭДТА связывания им кальция [100, 101]. В недавней работе по исследованию древней ДНК раствор, содержащий ЭГТА, был успешно использован для выделения ДНК из зуба [45], что также подтверждает перспективность его использования в палеогенетических исследованиях.

Среди альтернативных растворов для лизиса костной ткани, наиболее часто используемых для выделения ДНК из древних костей, — растворы, содержащие гуанидинтиоционат натрия (GuSCN) или трис-буферный солевой раствор (табл. 1). В случае последнего для успешного лизиса, так же как и при использовании, например, фосфатного буфера, требуется добавление протеиназы К, необходимой для расщепления белков и высвобождения связанной с ними ДНК [70, 83]. Гуанидинтиоционат натрия является сильным денатурирующим белок агентом, способным денатурировать не только

растворенные белки, но и белки, связанные с гидроксиапатитом кости. Предполагается также, что он, как и фосфат, может напрямую вытеснять ДНК из гидроксиапатитного матрикса кости [70]. Благодаря этим его свойствам растворы на основе гуанидинтиоционата достаточно широко применяются в палеогеомных исследованиях [75, 76].

В целом, учитывая тот факт, что ДНК в древних костях связана как с минеральным компонентом кости, так и с белковым, наиболее эффективными являются растворы, способствующие высвобождению ДНК из обеих фракций. Несмотря на то что была показана возможность получения ДНК путем полной деминерализации кости [73], максимальный выход древней ДНК при ее выделении из костных фрагментов возможен только при комбинации в составе раствора для лизиса двух компонентов: одного — для растворения кальция и второго — для расщепления белков. При этом условия проведения лизиса костного материала (в первую очередь время и температура) должны быть подобраны таким образом, чтобы минимизировать фрагментацию ДНК во время проведения этой процедуры.

Очистка ДНК

После экстракции ДНК из кости в раствор ее дальнейшую очистку проводят преимущественно двумя основными способами: с помощью классического фенол-хлороформного метода или с использованием силики (silica, диоксид кремния, SiO₂). Силика обладает способностью эффективно связывать на своей поверхности молекулы ДНК, которые далее в связанном состоянии удобно очищать как от компонентов лизирующего раствора, так и от других соединений, которые могут ингибировать последующие ферментативные реакции [102]. В случае использования больших объемов лизирующего раствора, необходимых для успешной деминерализации кости, перед дальнейшей очисткой проводят концентрирование раствора ДНК, например с помощью концентрирующих колонок Amicon-30 [28, 79, 103] или преципитируют ДНК изопропанолом [84]. Необходимо заметить, что при выборе концентрирующих колонок важное значение имеет размер фрагментов ДНК, который ожидается получить и который необходим для проведения дальнейшего анализа. Например, при исследовании останков гейдельбергского человека (Sima de los Huesos) длина фрагментов эндогенной ДНК не превышала 45 пн [98]. Фрагменты ДНК такого размера могут быть полностью потеряны, если проводить выделение ДНК с использованием, например, концентрирующих колонок Amicon-30, размер пор которых может быть слишком большим для коротких фрагментов. В случае подобной сильно фрагментированной древней ДНК необходимо либо ис-

пользовать мембраны с меньшим размером пор, либо, как было сделано авторами работы [98], использовать другой метод очистки ДНК.

Преципитация 2-изопропанолом — один из наиболее дешевых и простых способов получения ДНК из лизирующего раствора [83, 84], позволяющий быстро очистить ДНК от ингибиторов для последующих реакций. Однако из-за потенциально малого количества ДНК, которое, как правило, удается выделить из костных останков, существует вероятность потери ДНК во время осаждения. Проблема может быть частично решена, например, добавлением в раствор РНКового носителя, который может позволить получить визуализируемый осадок ДНК после преципитации, однако не увеличивает общий выход ДНК [104].

Силика (SiO_2) эффективно связывает все формы ДНК (двухцепочечная, одноцепочечная, кольцевая) даже в минимальных количествах. Первоначально метод выделения ДНК с применением силики был основан на связывании ДНК с силикой в растворе [81]. Позже многие коммерческие фирмы разработали так называемые “центрифужные колоноки”, в которых силика нанесена на специальную мембрану [74, 82]. Первое успешное выделение ДНК из костной ткани с использованием колонок фирмы “Qiagen” с силикой было проведено в 1998 г. в рамках генетической экспертизы предполагаемых останков царской семьи Романовых [105]. Использование таких колонок значительно удобнее, чем применение растворов, содержащих силику, а специальные буферные составы, предлагаемые исследователями и фирмами-производителями колонок, позволяют проводить очистку и даже отбор фрагментов ДНК нужного размера. Размер фрагментов ДНК, которые могут быть связаны соответствующими колонками, является критически важным параметром, который необходимо учитывать при выборе колонок с силикой для очистки коротких фрагментов древней ДНК. Многочисленные модификации метода, в основе которого лежит использование силики, предлагают различные составы растворов для связывания ДНК с силикой и для последующей ее отмывки и элюции [42, 74, 75, 106–109], в том числе готовые решения для автоматизации процесса очистки [110].

На данный момент нет универсального способа эффективного выделения древней ДНК. Целая серия недавних работ посвящена сравнению различных методов выделения ДНК из костных останков. Для сравнения используют не только лабораторные протоколы, но и готовые коммерческие наборы, в том числе рекомендованные для использования в криминалистике. Так, например, сравнительные исследования показали большую эффективность выделения ДНК с использованием силики (*silica*-based метод) на колонках по сравнению со стан-

дартной фенол-хлороформной очисткой [111]. Тем не менее выделение ДНК с использованием фенол-хлороформа может быть успешным в случае использования костей хорошей сохранности, а также для мумифицированных и мягких тканей [19, 73]. Обработка костного порошка гипохлоритом натрия позволяет эффективно удалить контаминацию и получить доступ к ДНК, находящейся в кристаллических агрегатах, не подверженных воздействию гипохлорита натрия [112]. Использование лизирующего буфера PrepFiler BTA из коммерческого набора производства фирмы Thermo Fischer Scientific дает возможность значительно снизить время лизиса костной ткани: 2 ч вместо более чем 12 ч, рекомендуемых при использовании ЭДТА [113].

В настоящее время многие коммерческие фирмы предлагают свои решения для выделения ДНК из костного материала, которые могут быть использованы как для анализа древней ДНК, так и в области криминалистики, а существующее оборудование позволяет автоматизировать процесс выделения ДНК из костей. Одним из перспективных и широко используемых в криминалистике коммерческих наборов для выделения ДНК из костей является PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit (Thermo Fischer Scientific). После быстрого лизиса со специальным буфером ДНК, высвобожденную из кости в раствор, связывают с магнитными частицами, покрытыми силикой, что позволяет минимизировать потери ДНК. Важным преимуществом данного набора является то, что эффективность связывания с магнитными частицами не зависит от размера фрагментов ДНК, таким образом удается избежать потерь очень коротких фрагментов, характерных для древней ДНК. Набор реагентов DNA Investigator Kit (Qiagen), а также другие колонки этого производителя давно успешно используются в палеогенетических лабораториях благодаря своему удобству — очистка ДНК происходит на силике, связанной с мембраной колонки [107]. Следует, однако, заметить, что эффективность связывания ДНК с колонками Qiagen (как и в целом с силикой) напрямую зависит от состава и уровня pH связывающего раствора, поэтому крайне важно при работе с древним костным материалом контролировать эти параметры, в частности использовать специальные растворы, рекомендованные фирмой для очистки очень коротких фрагментов ДНК (менее 70 пн). Кроме того, необходимо минимизировать возможные потери коротких фрагментов ДНК при центрифугировании, проводя связывание ДНК с мембраной и ее отмывку на невысоких скоростях центрифугирования. Недавно на рынке появился набор FSC Casework kit (Promega), позволяющий проводить эффективный лизис костного порошка всего за два часа и в полуавтоматическом режиме выделять ДНК из костей

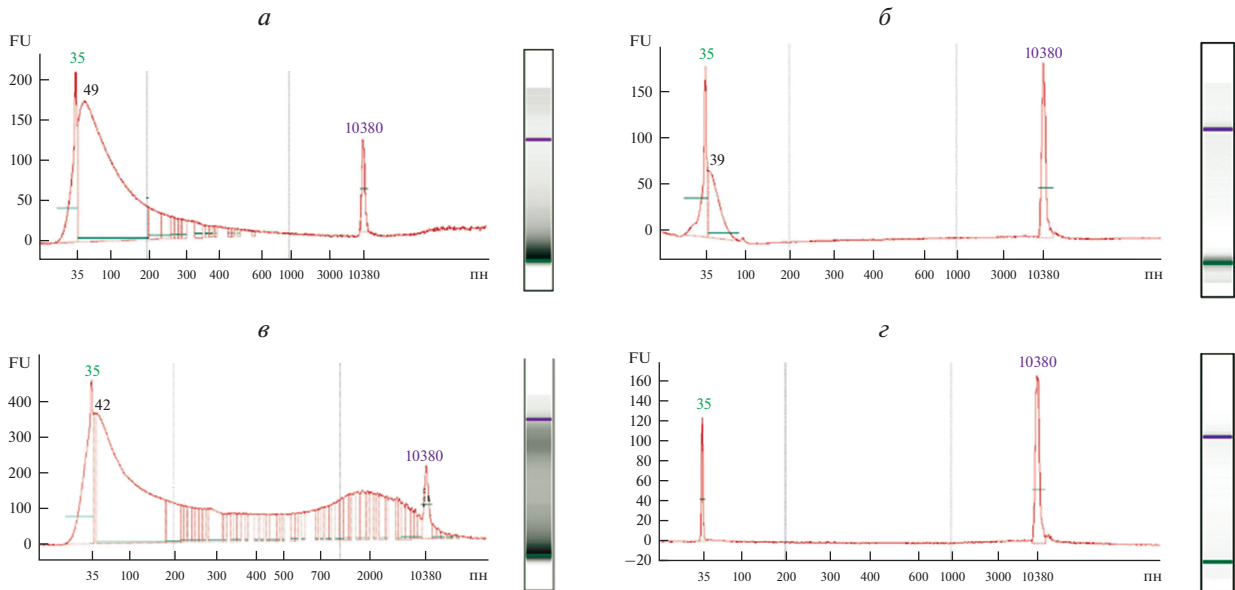


Рис. 3. Профиль длин фрагментов, характерный для древней ДНК, оцененный с использованием Bioanalyzer 2100 (Agilent), собственные данные. *а* – ДНК, выделенная из каменной кости (II–V в. н.э.), содержит преимущественно короткие фрагменты древней эндогенной ДНК длиной менее 200 пн; *б* – ДНК, выделенная из зуба скифа (III–IV в. до н.э.), содержит только очень короткие фрагменты ДНК менее 100 пн; *в* – ДНК, выделенная из височной кости скифа (IV в. до н.э.), наряду с короткими фрагментами древней эндогенной ДНК (менее 100 пн) содержит высокомолекулярные (более 1000 пн) фрагменты, наиболее вероятно соответствующие бактериальному загрязнению образца; *г* – негативный контроль выделения ДНК, должен использоваться при каждой экстракции ДНК. Фрагменты размером 35 и 10380 пн соответствуют маркеру длин ДНК.

[114], что может быть востребовано при проведении масштабных популяционных палеогенетических исследований.

ГЕНОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ ДРЕВНЕЙ ДНК

Анализ выделенной ДНК

Проведение любых экспериментов с выделенной ДНК обычно требует проведения ее качественной и количественной оценки, чтобы определить необходимый для той или иной реакции объем полученного препарата ДНК. В ранних работах, когда для выделения ДНК использовали достаточно крупные фрагменты костей или зубов (до нескольких грамм), такая оценка была возможна электрофоретическими или спектрофлуориметрическими методами. В последние годы новые технологии выделения ДНК позволяют проводить экстракцию ДНК из минимальных количеств костных останков – от 9 мг [61]. Выделенную из таких количеств костного материала ДНК зачастую невозможно оценить стандартными количественными методами. В этом случае возможна качественная оценка ДНК, например с использованием высокочувствительных капиллярных анализаторов (рис. 3). Некоторые исследователи предлагают не проводить никаких оценок ДНК, выделенной из 10–50 мг ткани, а напрямую ис-

пользовать ее, например для приготовления геномных библиотек для секвенирования [115], а оценку аутентичности полученной ДНК проводить уже по результатам секвенирования по наличию “древних усов” (рис. 4) – характерной для древней ДНК картине деградации ДНК, обусловленной заменами цитозина на тимин преимущественно на концах фрагментов древней ДНК [116].

ДНК-модификации и репарация древней ДНК

Присутствие характерных для древней ДНК модификаций может быть использовано не только для проверки аутентичности выделенной ДНК (рис. 4). В случае высокого уровня контаминации древнего образца современными молекулами ДНК наличие специфичных С>Т замен в анализируемых фрагментах является маркером того, что данные фрагменты принадлежат древнему образцу, а не являются современной контаминацией. Такой подход был успешно использован, например, при исследовании геномов неандертальцев – перед проведением геномного анализа из всех полученных в результате секвенирования и картирования на референсный геном коротких последовательностей ДНК отбирали только те, которые содержат на концах “древние” замены С>Т [117–119]. С другой стороны, такой тип модификаций древней ДНК может потенциально приводить к ошибкам

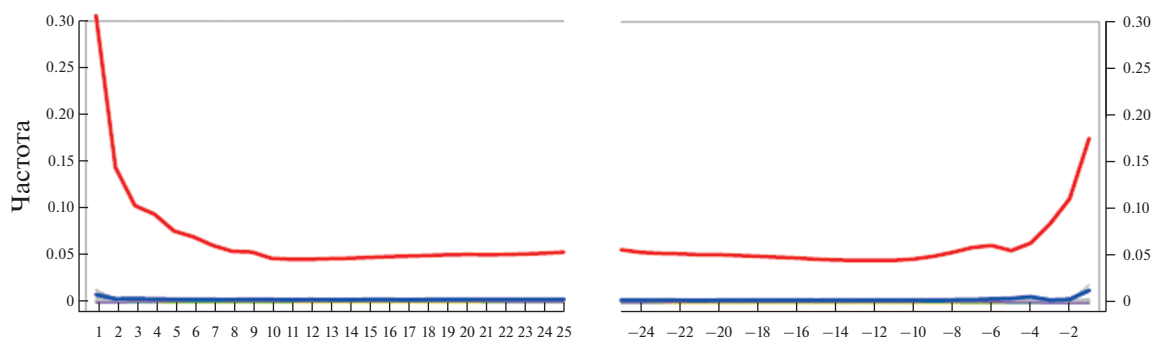


Рис. 4. Повышение частоты замен С>Т (красная кривая на рисунке) к концам фрагментов ДНК, характерное для древней ДНК. Результаты получены с помощью программного пакета MapDamage2 [116] с использованием данных геномного секвенирования ДНК из костных останков скифского захоронения IV в. до н.э.

при непосредственном определении последовательности древней ДНК и анализе мутаций [120]. Чтобы уменьшить число таких ошибок, было предложено использовать специальные ферменты, узнающие урацилы, которые появляются в древней ДНК в результате дезаминирования цитозина. Применение фермента урацил-ДНК-гликозилазы (UDG) позволяет удалить модифицированные основания из молекулы ДНК, а последующее использование эндонуклеазы VIII (Endo VIII) приводит к разрезанию молекулы ДНК в сайте, где был удален нуклеотид [121, 122], альтернативный результат может быть получен при использовании готовой смеси двух ферментов, например смеси USER (New England Biolabs). Таким образом удается понизить число потенциальных ложноположительных замен С>Т в последовательности древней ДНК. Главным недостатком такого способа устранения ошибок секвенирования является то, что эндонуклеаза способствует еще большей фрагментации исходно коротких фрагментов древней ДНК. Кроме того, удаление этих “древних” меток делает практически невозможным анализ аутентичности древней ДНК – после обработки ДНК значительно уменьшается размер “древних усов” в анализируемых фрагментах ДНК. Для решения такой проблемы при анализе древних образцов следует проводить анализ как нативной ДНК, содержащей “древние” замены С>Т, – для подтверждения ее аутентичности, так и ДНК, обработанной урацил-ДНК-гликозилазой – для снижения вероятности ошибки при определении последовательности ДНК. Протокол частичного удаления урацилов [122], включающий использование ингибитора урацил-ДНК-гликозилазы и позволяющий сохранить “древние” замены только на концах последовательностей, также может быть эффективно использован при анализе древней ДНК. В последние годы все более широкое применение для репарации древней ДНК находят смеси ферментов, которые позволяют проводить не только репарацию дезаминированных цитози-

нов в древней ДНК, но и удалять ряд других модификаций ДНК, которые потенциально могут вносить ошибки в результаты геномного анализа, например смеси ферментов FFPE DNA Repair Mix [123, 124] и PreCR MIX [125, 126] производства New England Biolabs (табл. 2).

Приготовление фрагментных библиотек и секвенирование

Технология масштабного параллельного секвенирования имеет несколько преимуществ по сравнению с другими методами секвенирования применительно к анализу древней ДНК. Во-первых, в рамках одного эксперимента возможно определение последовательности нуклеотидов всех фрагментов ДНК, которые были выделены из древнего (в том числе костного) материала. Это дает возможность анализировать даже молекулы ДНК, присутствующие в минорном количестве в полученном препарате древней ДНК. Во-вторых, в отличие от классических технологий секвенирования масштабное параллельное секвенирование позволяет определять последовательности экстремально коротких фрагментов ДНК – длиной всего несколько нуклеотидов. Это дает возможность проведения геномного анализа для образцов ДНК в которых сильно фрагментирована, и секвенирование которых было практически невозможно методом Сенгера.

Основной целью при подготовке ДНК для глубокого секвенирования является добавление к концам фрагментов ДНК специальных адаптерных последовательностей, необходимых для отжига праймера, с которого будет происходить амплификация ДНК при секвенировании. В последние годы был разработан целый ряд подходов для приготовления геномных библиотек из древней ДНК [127]. Среди них наиболее эффективным является метод, основанный на использовании одноцепочечных фрагментов ДНК [115, 128]. В общих чертах он заключается в том, что перед пригото-

Таблица 2. Ферменты и смеси ферментов, используемые для репарации древней ДНК

Наименование фермента или смеси ферментов	Повреждения древней ДНК, которые могут быть репарированы	Ссылка
Урацил-ДНК-гликозилазы (UDG)	Дезаминирование цитозина	[121]
Эндонуклеаза VIII	Апуриновые и апиримидиновые сайты	[121]
USER (New England Biolabs)	Дезаминирование цитозина, апуриновые и апиримидиновые сайты	[121]
FFPE DNA Repair Mix (New England Biolabs)	Дезаминирование цитозина, апуриновые и апиримидиновые сайты, одноцепочечные разрывы ДНК, модификации 3'-концов фрагментов ДНК, продукты окисления гуанина и пиримидинов	[123, 124]
PreCR [®] Repair Mix (New England Biolabs)	Дезаминирование цитозина, апуриновые и апиримидиновые сайты, одноцепочечные разрывы ДНК, модификации 3'-концов фрагментов ДНК, продукты окисления гуанина и пиримидинов	[125, 126]

лением геномных библиотек ДНК денатурируют нагреванием для получения одноцепочечных фрагментов, и далее адаптерные последовательности лигируют к каждой одноцепочечной молекуле. Такой подход позволяет значительно повысить количество информативных последовательностей ДНК, поскольку в случае повреждения одной из цепей, что характерно для древней ДНК, комплементарная ей цепь остается пригодна для анализа (значительная часть фрагментов древней ДНК, содержащих одноцепочечные разрывы, при использовании двуцепочечной ДНК для приготовления геномных будет потеряна) [115, 128]. Модификация данного протокола, основанного на одноцепочечной ДНК, также дает возможность на этапе приготовления библиотек селективно отбирать из тотального препарата ДНК только древние фрагменты, в которых присутствуют специфичные для древней ДНК модификации [129].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, за более чем 30 лет исследования ДНК из древних костных останков был наработан огромный методологический материал, позволяющий успешно извлекать ДНК и исследовать уникальный археологический материал, геномный анализ которого дает новую, недоступную ранее информацию об истории человеческих популяций, их возникновении, исчезновении и миграциях. Палеогеномные исследования требуют аккуратного и скрупулезного планирования всех этапов работы, от выбора образцов для анализа (в том числе при проведении археологических раскопок) до интерпретации полученных результатов исследования. Нами рассмотрены существующие методы выделения древней ДНК, используемые при исследовании костных останков человека, предложены направления их модификации и адаптации

для использования в полногеномном анализе, а также сделан обзор подходов для проведения геномного анализа этой ДНК с помощью масштабного параллельного секвенирования. Большинство методов может быть успешно адаптировано для анализа других археологических находок, с учетом специфики и анатомии. По мере совершенствования методологий все более древние образцы становятся доступными для проведения генетических исследований, а новые данные в области исследования древней ДНК обязательно внесут свой вклад в понимание исторических и эволюционных процессов прошлого.

Авторы работы выражают благодарность М.В. Добровольской, Н.А. Макарову (Институт археологии РАН) и А.П. Бужиловой (НИИ и Музей антропологии МГУ) за предоставленные образцы костного материала.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта Минобрнауки России, системный номер 075-10-2020-116 (номер гранта 13.1902.21.0023).

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. *Hagelberg E., Sykes B., Hedges R.* Ancient bone DNA amplified [5] // *Nature*. 1989. V. 342. № 6249. P. 485. <https://doi.org/10.1038/342485a0>
2. *Lindahl T.* Instability and decay of the primary structure of DNA // *Nature*. 1993. V. 362. № 6422. P. 709–715. <https://doi.org/10.1038/362709a0>
3. *Pääbo S., Wilson A.C.* Miocene DNA sequences – a dream come true? // *Curr. Biol*. 1991. V. 1. № 1.

- P. 45–46.
[https://doi.org/10.1016/0960-9822\(91\)90125-G](https://doi.org/10.1016/0960-9822(91)90125-G)
4. *Allentoft M.E., Collins M., Harker D. et al.* The half-life of DNA in bone: Measuring decay kinetics in 158 dated fossils // *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 2012. V. 279. № 1748. P. 4724–4733.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2012.1745>
 5. *van der Valk T., Pečnerová P., Díez-del-Molino D. et al.* Million-year-old DNA sheds light on the genomic history of mammoths // *Nature.* 2021. V. 591. № 7849. P. 265–269.
<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03224-9>
 6. *Van Der Plicht J., Bronk Ramsey C., Heaton T.J. et al.* Recent developments in calibration for archaeological and environmental samples // *Radiocarbon.* 2020. V. 62. № 4. P. 1095–1117.
<https://doi.org/10.1017/RDC.2020.22>
 7. *Horai S., Hayasaka K., Murayama K. et al.* DNA amplification from ancient human skeletal remains and their sequence analysis. // *Proc. Japan Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 1989. V. 65. № 10. P. 229–233.
<https://doi.org/10.2183/pjab.65.229>
 8. *Briggs A.W., Stenzel U., Johnson P.L.F. et al.* Patterns of damage in genomic DNA sequences from a Neanderthal // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. № 37. P. 14616–14621.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0704665104>
 9. *Frederico L.A., Shaw B.R., Kunkel T.A.* A sensitive genetic assay for the detection of cytosine deamination: determination of rate constants and the activation energy // *Biochemistry.* 1990. V. 29. № 10. P. 2532–2537.
<https://doi.org/10.1021/bi00462a015>
 10. *Dabney J., Meyer M., Pääbo S.* Ancient DNA damage // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013. V. 5. № 7.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012567>
 11. *Heyn P., Stenzel U., Briggs A.W. et al.* Road blocks on paleogenomes-polymerase extension profiling reveals the frequency of blocking lesions in ancient DNA // *Nucl. Acids Res.* 2010. V. 38. № 16.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkq572>
 12. *Trueman C.N., Martill D.M.* The long-term survival of bone: The role of bioerosion // *Archaeometry.* 2002. V. 44. № 3. P. 371–382.
<https://doi.org/10.1111/1475-4754.t01-1-00070>
 13. *Bell L.S., Skinner M.F., Jones S.J.* The speed of post mortem change to the human skeleton and its taphonomic significance // *Forensic Sci. Int.* 1996. V. 82. № 2. P. 129–140.
[https://doi.org/10.1016/0379-0738\(96\)01984-6](https://doi.org/10.1016/0379-0738(96)01984-6)
 14. *Turner-Walker G., Nielsen-Marsh C.M., Syversen U. et al.* Sub-micron spongiform porosity is the major ultrastructural alteration occurring in archaeological bone // *Int. J. Osteoarchaeol.* 2002. V. 12. № 6. P. 407–414.
<https://doi.org/10.1002/oa.642>
 15. *Romanowski G., Lorenz M.G., Wackernagel W.* Adsorption of plasmid DNA to mineral surfaces and protection against DNase I // *Appl. Environ. Microbiol.* 1991. V. 57. № 4. P. 1057–1061.
<https://doi.org/10.1128/aem.57.4.1057-1061.1991>
 16. *Demanèche S., Jocteur-Monrozier L., Quiquampoix H., Simonet P.* Evaluation of biological and physical protection against nuclease degradation of clay-bound plasmid DNA // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. V. 67. № 1. P. 293–299.
<https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.293-299.2001>
 17. *Brundin M., Figdor D., Sundqvist G., Sjögren U.* DNA binding to hydroxyapatite: A potential mechanism for preservation of microbial DNA // *J. Endod.* 2013. V. 39. № 2. P. 211–216.
<https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.09.013>
 18. *Sosa C., Vispe E., Núñez C. et al.* Association between ancient bone preservation and DNA yield: A multidisciplinary approach // *Am. J. Phys. Anthropol.* 2013. V. 151. № 1. P. 102–109.
<https://doi.org/10.1002/ajpa.22262>
 19. *Rogaev E.I., Moliaka Y.K., Malyarchuk B.A. et al.* Complete mitochondrial genome and phylogeny of pleistocene mammoth *Mammuthus primigenius* // *PLoS Biol.* 2006. V. 4. № 3. P. 0403–0410.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040073>
 20. *Götherström A., Collins M.J., Angerbjörn A., Lidén K.* Bone preservation and DNA amplification // *Archaeometry.* 2002. V. 44. № 3. P. 395–404.
<https://doi.org/10.1111/1475-4754.00072>
 21. *Schwarz C., Debruyne R., Kuch M. et al.* New insights from old bones: DNA preservation and degradation in permafrost preserved mammoth remains // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. № 10. P. 3215–3229.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkp159>
 22. *Poinar H.N., Artur Stankiewicz B.* Protein preservation and DNA retrieval from ancient tissues // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. № 15. P. 8426–8431.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.15.8426>
 23. *Colson I.B., Bailey J.F., Vercauteren M. et al.* The preservation of ancient DNA and bone diagenesis // *Anc. Biomol.* 1997. V. 1. № 2. P. 109–117.
 24. *Smith C.I., Chamberlain A.T., Riley M.S. et al.* The thermal history of human fossils and the likelihood of successful DNA amplification // *J. Hum. Evol.* 2003. V. 45. № 3. P. 203–217.
[https://doi.org/10.1016/S0047-2484\(03\)00106-4](https://doi.org/10.1016/S0047-2484(03)00106-4)
 25. *Pääbo S.* Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA // *Nature.* 1985. V. 314. № 6012. P. 644–645.
<https://doi.org/10.1038/314644a0>
 26. *Schuenemann V.J., Peltzer A., Welte B. et al.* Ancient Egyptian mummy genomes suggest an increase of Sub-Saharan African ancestry in post-Roman periods // *Nat. Commun.* 2017. V. 8.
<https://doi.org/10.1038/ncomms15694>
 27. *Gad Y.Z., Abu-Mandil Hassan N., Mousa D.M. et al.* Insights from ancient dna analysis of egyptian human mummies: Clues to disease and kinship // *Hum. Mol. Genet.* 2021. V. 30. № 2. P. R24–R28.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddaa223>
 28. *Rogaev E.I., Grigorenko A.P., Moliaka Y.K. et al.* Genomic identification in the historical case of the Nicholas II royal family // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. № 13. P. 5258–5263.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0811190106>
 29. *Grela M., Jakubczak A., Kowalczyk M. et al.* Effectiveness of various methods of DNA isolation from bones and teeth of animals exposed to high temperature // *J. Forensic Leg. Med.* 2021. V. 78.
<https://doi.org/10.1016/j.jflm.2021.102131>
 30. *Emery M.V., Bolhofner K., Winingear S. et al.* Reconstructing full and partial STR profiles from severely burned human remains using comparative ancient and forensic DNA extraction techniques // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2020. V. 46.
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2020.102272>

31. *Ottoni C., Koon H.E.C., Collins M.J. et al.* Preservation of ancient DNA in thermally damaged archaeological bone // *Naturwissenschaften*. 2009. V. 96. № 2. P. 267–278.
<https://doi.org/10.1007/s00114-008-0478-5>
32. *Latham K.E., Miller J.J.* DNA recovery and analysis from skeletal material in modern forensic contexts // *Forensic Sci. Research*. 2019. V. 4. № 1. P. 51–59.
<https://doi.org/10.1080/20961790.2018.1515594>
33. *Prado M., Franco C.M., Fente C.A. et al.* Comparison of extraction methods for the recovery, amplification and species-specific analysis of DNA from bone and bone meals // *Electrophoresis*. 2002. V. 23. № 7–8. P. 1005–1012.
[https://doi.org/10.1002/1522-2683\(200204\)23:7/8<1-005::AID-ELPS1005>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200204)23:7/8<1-005::AID-ELPS1005>3.0.CO;2-1)
34. *Pruvost M., Schwarz R., Correia V.B. et al.* Freshly excavated fossil bones are best for amplification of ancient DNA // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. № 3. P. 739–744.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0610257104>
35. *Bowes J.H., Murray M.M.* The chemical composition of teeth // *Biochem. J*. 1935. V. 29. № 12. P. 2721–2727.
<https://doi.org/10.1042/bj0292721>
36. *Beniash E., Stiffler C.A., Sun C.Y. et al.* The hidden structure of human enamel // *Nat. Commun*. 2019. V. 10. № 1.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-12185-7>
37. *Malaver P.C., Yunis J.J.* Different dental tissues as source of DNA for human identification in forensic cases // *Croat. Med. J*. 2003. V. 44. № 3. P. 306–309.
38. *Trivedi R., Chattopadhyay P., Kashyap V.K.* A new improved method for extraction of DNA from teeth for the analysis of hypervariable loci // *Am. J. Forensic Med. Pathol*. 2002. V. 23. № 2. P. 191–196.
<https://doi.org/10.1097/00000433-200206000-00016>
39. *Pötsch L., Meyer U., Rothschild S. et al.* Application of DNA techniques for identification using human dental pulp as a source of DNA // *Int. J. Legal Med*. 1992. V. 105. № 3. P. 139–143.
<https://doi.org/10.1007/BF01625165>
40. *Schuenemann V.J., Singh P., Mendum T.A. et al.* Genome-wide comparison of medieval and modern *Mycobacterium leprae* // *Science*. 2013. V. 341. № 6142. P. 179–183.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1238286>
41. *Higgins D., Austin J.J.* Teeth as a source of DNA for forensic identification of human remains: A Review // *Science and Justice*. 2013. V. 53. № 4. P. 433–441.
<https://doi.org/10.1016/j.scijus.2013.06.001>
42. *Dabney J., Meyer M.* Extraction of highly degraded DNA from ancient bones and teeth // *Methods Mol. Biol*. 2019. V. 1963. P. 25–29.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9176-1_4
43. *Adler C.J., Haak W., Donlon D., Cooper A.* Survival and recovery of DNA from ancient teeth and bones // *J. Archaeol. Sci*. 2011. V. 38. № 5. P. 956–964.
<https://doi.org/10.1016/j.jas.2010.11.010>
44. *Campos P.F., Craig O.E., Turner-Walker G. et al.* DNA in ancient bone – Where is it located and how should we extract it? // *Ann. Anat*. 2012. V. 194. № 1. P. 7–16.
<https://doi.org/10.1016/j.aanat.2011.07.003>
45. *Андреева Т.В., Малаярчук А.Б., Григоренко А.П. и др.* Археогенетический анализ индивида из захоронения с территории древнего Ярославского Кремля // *Краткие сообщ. Института археологии*. 2021. Т. 265. С. 209–308.
46. *Sawyer S., Renaud G., Viola B. et al.* Nuclear and mitochondrial DNA sequences from two Denisovan individuals // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2015. V. 112. № 51. P. 15696–15700.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1519905112>
47. *Adler C.J., Haak W., Donlon D., Cooper A.* Survival and recovery of DNA from ancient teeth and bones // *J. Archaeol. Sci*. 2011. V. 38. № 5. P. 956–964.
<https://doi.org/10.1016/j.jas.2010.11.010>
48. *Damgaard P.B., Margaryan A., Schroeder H. et al.* Improving access to endogenous DNA in ancient bones and teeth // *Sci. Rep*. 2015. V. 5. № 1. P. 11184.
<https://doi.org/10.1038/srep11184>
49. *Freeman E.* Periodontium // *Oral Histology: Development, Structure, and Function* / Ed. Ten Cate A.R. Mosby, St. Louis, 1994. P. 276–312.
50. *Lam Y.M., Chen X., Pearson O.M.* Intertaxonomic variability in patterns of bone density and the differential representation of bovid, cervid, and equid elements in the archaeological record // *Am. Antiq*. 1999. V. 64. № 2. P. 343–362.
<https://doi.org/10.2307/2694283>
51. *Hansen H.B., Damgaard P.B., Margaryan A. et al.* Comparing ancient DNA preservation in petrous bone and tooth cementum // *PLoS One*. 2017. V. 12. № 1.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170940>
52. *Pinhasi R., Fernandes D., Sirak K. et al.* Optimal ancient DNA yields from the inner ear part of the human petrous bone // *PLoS One*. 2015. V. 10. № 6.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129102>
53. *Pinhasi R., Fernandes D.M., Sirak K., Cheronet O.* Isolating the human cochlea to generate bone powder for ancient DNA analysis // *Nat. Protoc*. 2019. V. 14. № 4. P. 1194–1205.
<https://doi.org/10.1038/s41596-019-0137-7>
54. *Sirak K., Fernandes D., Cheronet O. et al.* Human auditory ossicles as an alternative optimal source of ancient DNA // *Genome Res*. 2020. V. 30. № 3. P. 427–436.
<https://doi.org/10.1101/gr.260141.119>
55. *Ponce de León M.S., Koesbardiati T., Weissmann J.D. et al.* Human bony labyrinth is an indicator of population history and dispersal from Africa // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2018. V. 115. № 16. P. 4128–4133.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1717873115>
56. *Parker C., Rohrlach A.B., Friederich S. et al.* A systematic investigation of human DNA preservation in medieval skeletons // *Sci. Rep*. 2020. V. 10. № 1.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-75163-w>
57. *Krings M., Stone A., Schmitz R.W. et al.* Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans // *Cell*. 1997. V. 90. № 1. P. 19–30.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80310-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80310-4)
58. *Lalueza C., Pérez-Pérez A., Prats E. et al.* Lack of founding Amerindian mitochondrial DNA lineages in extinct Aborigines from Tierra del Fuego-Patagonia // *Hum. Mol. Genet*. 1997. V. 6. № 1. P. 41–46.
<https://doi.org/10.1093/hmg/6.1.41>
59. Преступление века: Материалы следствия. Документально-архивная хронология событий, связанных с гибелью Российского императора Николая II, его семьи и их приближенных: в 3 т. М.: Следственный комитет РФ, 2021. Т. 2.
60. *Margaryan A., Hansen H.B., Rasmussen S. et al.* Ancient pathogen DNA in human teeth and petrous

- bones // *Ecol. EV.* 2018. V. 8. № 6. P. 3534–3542.
<https://doi.org/10.1002/ece3.3924>
61. Hajdinjak M., Fu Q., Hübner A. et al. Reconstructing the genetic history of late Neanderthals // *Nature.* 2018. V. 555. № 7698. P. 652–656.
<https://doi.org/10.1038/nature26151>
 62. Григоренко А.П., Боринская С.А., Янковский Н.К., Рогов Е.И. Достижения и особенности в работе с древней ДНК и ДНК из сложных криминалистических образцов // *Акта Naturae* (русскоязычная версия). 2009. Т. 1. № 3.
 63. Pálsdóttir A.H., Bläuer A., Rannamäe E. et al. Not a limitless resource: Ethics and guidelines for destructive sampling of archaeofaunal remains // *R. Soc. Open Sci.* 2019. V. 6. № 10.
<https://doi.org/10.1098/rsos.191059>
 64. Kemp B.M., Winters M., Monroe C., Barta J.L. How much DNA is lost? Measuring DNA loss of short-tandem-repeat length fragments targeted by the PowerPlex 16® system using the Qiagen MinElute Purification Kit // *Hum. Biol.* 2014. V. 86. № 4. P. 313–329.
<https://doi.org/10.13110/humanbiology.86.4.0313>
 65. Montiel R., Malgosa A., Francalacci P. Authenticating ancient human mitochondrial DNA // *Hum. Biol.* 2001. V. 73. № 5. P. 689–713.
<https://doi.org/10.1353/hub.2001.0069>
 66. Ginther C., Issel-Tarver L., King M.C. Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth // *Nat. Genet.* 1992. V. 2. № 2. P. 135–138.
<https://doi.org/10.1038/ng1092-135>
 67. Champlot S., Berthelot C., Pruvost M. et al. An efficient multistrategy DNA decontamination procedure of PCR reagents for hypersensitive PCR applications // *PLoS One.* 2010. V. 5. № 9.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013042>
 68. Morales Colón E., Hernández M., Candelario M. et al. Evaluation of a freezer mill for bone pulverization prior to DNA extraction: an improved workflow for STR analysis // *J. Forensic Sci.* 2018. V. 63. № 2. P. 530–535.
<https://doi.org/10.1111/1556-4029.13551>
 69. Stone A.C., Milner G.R., Paäbo S., Stoneking M. Sex determination of ancient human skeletons using DNA // *Am. J. Phys. Anthropol.* 1996. V. 99. № 2. P. 231–238.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8644\(199602\)99:2<231::AID-AJPA1>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8644(199602)99:2<231::AID-AJPA1>3.0.CO;2-1)
 70. Rohland N., Siedel H., Hofreiter M. Nondestructive DNA extraction method for mitochondrial DNA analyses of museum specimens // *Biotechniques.* 2004. V. 36. № 5. P. 814–821.
<https://doi.org/10.2144/04365st05>
 71. Bolnick D.A., Bonine H.M., Mata-Míguez J. et al. Nondestructive sampling of human skeletal remains yields ancient nuclear and mitochondrial DNA // *Am. J. Phys. Anthropol.* 2012. V. 147. № 2. P. 293–300.
<https://doi.org/10.1002/ajpa.21647>
 72. Harney É., Cheronet O., Fernandes D.M. et al. A minimally destructive protocol for DNA extraction from ancient teeth // *Genome Res.* 2021. V. 31. № 3. P. 472–483.
<https://doi.org/10.1101/GR.267534.120>
 73. Loreille O.M., Diegoli T.M., Irwin J.A. et al. High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2007. V. 1. № 2. P. 191–195.
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2007.02.006>
 74. Yang D.Y., Eng B., Wayne J.S. et al. Technical note: Improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns // *Am. J. Phys. Anthropol.* 1998. V. 105. № 4. P. 539–543.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8644\(199804\)105:4<539::AID-AJPA10>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8644(199804)105:4<539::AID-AJPA10>3.0.CO;2-1)
 75. Höss M., Pääbo S. DNA extraction from pleistocene bones by a silica-based purification method // *Nucleic Acids Res.* 1993. V. 21. № 16. P. 3913–3914.
<https://doi.org/10.1093/nar/21.16.3913>
 76. Voong C.P., Spencer P.S., Navarrete C. V. et al. HLA-DR genotyping and mitochondrial DNA analysis reveal the presence of family burials in a fourth century Romano-British Christian cemetery // *Front. Genet.* 2017. V. 8. № DEC.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00182>
 77. Kalmár T., Bachrati C.Z., Marcsik A., Raskó I. A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones // *Nucl. Acids Res.* 2000. V. 28. № 12. P. 67.
<https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e67>
 78. Hofreiter M., Rabeder G., Jaenicke-Després V. et al. Evidence for reproductive isolation between Cave Bear populations // *Curr. Biol.* 2004. V. 14. № 1. P. 40–43.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.12.035>
 79. Leonard J.A., Wayne R.K., Cooper A. Population genetics of Ice Age brown bears // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. № 4. P. 1651–1654.
<https://doi.org/10.1073/pnas.040453097>
 80. Scheible M., Loreille O., Just R., Irwin J. Short tandem repeat typing on the 454 platform: Strategies and considerations for targeted sequencing of common forensic markers // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2014. V. 12. P. 107–119.
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.04.010>
 81. Boom R., Sol C.J.A., Salimans M.M.M. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids // *J. Clin. Microbiol.* 1990. V. 28. № 3. P. 495–503.
<https://doi.org/10.1128/jcm.28.3.495-503.1990>
 82. Gamba C., Hanghøj K., Gaunitz C. et al. Comparing the performance of three ancient DNA extraction methods for high-throughput sequencing // *Mol. Ecol. Resour.* 2016. V. 16. № 2. P. 459–469.
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12470>
 83. Vigilant L., Hofreiter M., Siedel H., Boesch C. Paternity and relatedness in wild chimpanzee communities // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. № 23. P. 12890–12895.
<https://doi.org/10.1073/pnas.231320498>
 84. Hänni C., Brousseau T., Laudet V., Stehelin D. Isopropanol precipitation removes PCR inhibitors from ancient bone extracts // *Nucl. Acids Res.* 1995. V. 23. № 5. P. 881–882.
<https://doi.org/10.1093/nar/23.5.881>
 85. Richards M.B., Sykes B.C., Hedges R.E.M. Authenticating DNA extracted from ancient skeletal remains // *J. Archaeol. Sci.* 1995. V. 22. № 2. P. 291–299.
<https://doi.org/10.1006/jasc.1995.0031>
 86. Keyser-Tracqui C., Crubézy E., Ludes B. Nuclear and mitochondrial DNA analysis of a 2,000-year-old necropolis in the Egyin Gol valley of Mongolia // *Am. J. Hum. Genet.* 2003. V. 73. № 2. P. 247–260.
<https://doi.org/10.1086/377005>
 87. Lalueza-Fox C., Calderón F.L., Calafell F. et al. MtDNA from extinct Tainos and the peopling of the Caribbean // *Ann. Hum. Genet.* 2001. V. 65. № 2. P. 137–151.
<https://doi.org/10.1046/j.1469-1809.2001.6520137.x>

88. *Palmirotta R., Verginelli F., Di Tota G. et al.* Use of a multiplex polymerase chain reaction assay in the sex typing of DNA extracted from archaeological bone // *Int. J. Osteoarchaeol.* 1997. V. 7. № 6. P. 605–609. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-1212\(199711/12\)7:6<605::aid-oa365>3.0.co;2-r](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-1212(199711/12)7:6<605::aid-oa365>3.0.co;2-r)
89. *Korlević P., Meyer M.* Pretreatment: Removing DNA contamination from ancient bones and teeth using sodium hypochlorite and phosphate // *Methods Mol. Biol.* 2019. V. 1963. P. 15–19. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9176-1_2
90. *Korlević P., Gerber T., Gansauge M.-T. et al.* Reducing microbial and human contamination in DNA extractions from ancient bones and teeth // *Biotechniques.* 2015. V. 59. № 2. P. 87–93. <https://doi.org/10.2144/000114320>
91. *Weiner S., Price P.A.* Disaggregation of bone into crystals // *Calcif. Tissue Int.* 1986. V. 39. № 6. P. 365–375. <https://doi.org/10.1007/BF02555173>
92. *Salamon M., Tuross N., Arensburg B., Weiner S.* Relatively well preserved DNA is present in the crystal aggregates of fossil bones // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. № 39. P. 13783–13788. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503718102>
93. *Hayatsu H., Pan S. kung, Ukita T.* Reaction of sodium hypochlorite with nucleic acids and their constituents // *Chem. Pharm. Bull.* 1971. V. 19. № 10. P. 2189–2192. <https://doi.org/10.1248/cpb.19.2189>
94. *Prince A.M., Andrus L.* PCR: How to kill unwanted DNA // *Biotechniques.* 1992. V. 12. № 3.
95. *Rohland N., Glocke I., Aximu-Petri A., Meyer M.* Extraction of highly degraded DNA from ancient bones, teeth and sediments for high-throughput sequencing // *Nat. Protoc.* 2018. V. 13. № 11. P. 2447–2461. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0050-5>
96. *Ginolhac A., Vilstrup J., Stenderup J. et al.* Improving the performance of true single molecule sequencing for ancient DNA // *BMC Genomics.* 2012. V. 13. № 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-177>
97. *Orlando L., Ginolhac A., Raghavan M. et al.* True single-molecule DNA sequencing of a pleistocene horse bone // *Genome Res.* 2011. V. 21. № 10. P. 1705–1719. <https://doi.org/10.1101/gr.122747.111>
98. *Meyer M., Fu Q., Aximu-Petri A. et al.* A mitochondrial genome sequence of a hominin from Sima de los Huecos // *Nature.* 2014. V. 505. № 7483. P. 403–406. <https://doi.org/10.1038/nature12788>
99. *de Sousa S.M.G., Silva T.L.* Efeito do EDTA, EGTA, CDTA e ácido cítrico na desmineralização da dentina radicular: Estudo comparativo // *Braz. Oral Res. Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica – SBPqO.* 2005. V. 19. № 3. P. 188–192. <https://doi.org/10.1590/S1806-83242005000300006>
100. *Medina Cardenas M.E., Calvo Pérez V., Sánchez Planells U.* Comparison of the chelating capacity of EDTA and EGTA, a new demineralized agent, on molars *in vitro* // *Rev. Dent. Chile.* 1989. V. 80. № 1. P. 4–10.
101. *Tripodi D., D'Ercole S., De Fazio P., Spoto G.* Demineralizing action of EGTA in endodontics. // *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 2007. V. 20. № 1. Suppl. 1. P. 93–96. <https://doi.org/10.1177/039463200702001s18>
102. *Simpson T.A., Smith R.J.H.* Amplification of mitochondrial DNA from archival temporal bone specimens // *Laryngoscope.* 1995. V. 105. № 1. P. 28–34. <https://doi.org/10.1288/00005537-199501000-00009>
103. *Hagelberg E., Clegg J.B.* Isolation and characterization of DNA from archaeological bone // *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 1991. V. 244. № 1309. P. 45–50. <https://doi.org/10.1098/rspb.1991.0049>
104. *Higgins D., Kaidonis J., Townsend G., Austin J.J.* Evaluation of carrier RNA and low volume demineralization for recovery of nuclear DNA from human teeth // *Forensic Sci. Med. Pathol.* 2014. V. 10. № 1. P. 56–61. <https://doi.org/10.1007/s12024-013-9519-2>
105. *Аксючиц Виктор.* Покаяние: Материалы правительственной Комиссии по изучению вопросов, связанных с исследованием и перезахоронением останков Российского Императора Николая II и членов его семьи. М.: Выбор, 1998. 288 с.
106. *Katevatis C., Fan A., Klapperich C.M.* Low concentration DNA extraction and recovery using a silica solid phase // *PLoS One.* 2017. V. 12. № 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176848>
107. *Bouwman A.S., Brown T.A.* Comparison between silica-based methods for the extraction of DNA from human bones from 18th to mid-19th century London // *Anc. Biomol.* 2002. V. 4. № 4. P. 173–178. <https://doi.org/10.1080/1358612021000028470>
108. *Rohland N., Siedel H., Hofreiter M.* A rapid column-based ancient DNA extraction method for increased sample throughput // *Mol. Ecol. Resour.* 2010. V. 10. № 4. P. 677–683. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02824.x>
109. *Dabney J., Knapp M., Glocke I. et al.* Complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultrashort DNA fragments // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. № 39. P. 15758–15763. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314445110>
110. *Amory S., Huel R., Bilić A. et al.* Automatable full demineralization DNA extraction procedure from degraded skeletal remains // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2012. V. 6. № 3. P. 398–406. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.08.004>
111. *Marshall P.L., Stoljarova M., Schmedes S.E. et al.* A high volume extraction and purification method for recovering DNA from human bone // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2014. V. 12. P. 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.06.011>
112. *Jakubowska J., Maciejewska A., Pawłowski R.* Comparison of three methods of DNA extraction from human bones with different degrees of degradation // *Int. J. Legal Med.* 2012. V. 126. № 1. P. 173–178. <https://doi.org/10.1007/s00414-011-0590-5>
113. *Hasap L., Chotigeat W., Pradutkanchana J. et al.* A novel, 4-h DNA extraction method for STR typing of casework bone samples // *Int. J. Legal Med.* 2020. <https://doi.org/10.1007/s00414-019-02232-9>
114. *Duijs F.E., Sijen T.* A rapid and efficient method for DNA extraction from bone powder // *Forensic Sci. Int. Reports.* 2020. V. 2. P. 100099. <https://doi.org/10.1016/j.fsir.2020.100099>
115. *Gansauge M.T., Meyer M.* Single-stranded DNA library preparation for the sequencing of ancient or damaged DNA // *Nat. Protoc.* 2013. V. 8. № 4. P. 737–748. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.038>
116. *Jónsson H., Ginolhac A., Schubert M. et al.* mapDamage2.0: fast approximate Bayesian estimates of ancient DNA damage parameters. // *Bioinformatics.* 2013.

- V. 29. № 13. P. 1682–1684.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt193>
117. Zavala E.I., Jacobs Z., Vernot B. et al. Pleistocene sediment DNA reveals hominin and faunal turnovers at Denisova Cave // *Nature*. 2021.
<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03675-0>
118. Vernot B., Zavala E.I., Gómez-Olivencia A. et al. Unearthing Neanderthal population history using nuclear and mitochondrial DNA from cave sediments // *Science*. 2021. V. 372. № 6542.
<https://doi.org/10.1126/science.abf1667>
119. Bokelmann L., Hajdinjak M., Peyrégne S. et al. A genetic analysis of the Gibraltar Neanderthals // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2019. V. 116. № 31. P. 15610–15615.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1903984116>
120. Axelsson E., Willerslev E., Gilbert M.T.P., Nielsen R. The effect of ancient DNA damage on inferences of demographic histories // *Mol. Biol. EV*. 2008. V. 25. № 10. P. 2181–2187.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msn163>
121. Briggs A.W., Stenzel U., Meyer M. et al. Removal of deaminated cytosines and detection of *in vivo* methylation in ancient DNA // *Nucl. Acids Res*. 2009. V. 38. № 6.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkp1163>
122. Rohland N., Harney E., Mallick S. et al. Partial uracil-DNA-glycosylase treatment for screening of ancient DNA // *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci*. 2015. V. 370. № 1660.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0624>
123. Gorden E.M., Sturk-Andreaggi K., Marshall C. Repair of DNA damage caused by cytosine deamination in mitochondrial DNA of forensic case samples // *Forensic Sci. Int. Genet*. 2018. V. 34. P. 257–264.
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.02.015>
124. Segawa T., Yonezawa T., Mori H. et al. Ancient DNA reveals multiple origins and migration waves of extinct Japanese brown bear lineages // *R. Soc. Open Sci*. 2021. V. 8. № 8.
<https://doi.org/10.1098/rsos.210518>
125. Mouttham N., Klunk J., Kuch M. et al. Surveying the repair of ancient dna from bones via high-throughput sequencing // *Biotechniques*. 2015. V. 59. № 1. P. 19–25.
<https://doi.org/10.2144/000114307>
126. Andreeva T., Manakhov A., Kunizheva S., Rogaev E.I. Genetic evidence of authenticity of a hair shaft relic from the portrait of Tsesarevich Alexei, the son of the last Russian Emperor // *Biochem*. 2021. V. 86. № 12.
127. Orlando L., Gilbert M.T.P., Willerslev E. Reconstructing ancient genomes and epigenomes // *Nat. Rev. Genet*. 2015. V. 16. № 7. P. 395–408.
<https://doi.org/10.1038/nrg3935>
128. Gansauge M.-T., Gerber T., Glocke I. et al. Single-stranded DNA library preparation from highly degraded DNA using T4 DNA ligase // *Nucl. Acids Res*. 2017. V. 45. № 10. P. e79.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx033>
129. Gansauge M.-T., Meyer M. Selective enrichment of damaged DNA molecules for ancient genome sequencing // *Genome Res*. 2014. V. 24. № 9. P. 1543–1549.
<https://doi.org/10.1101/gr.174201.114>

Methodologies of Ancient DNA Extraction from Bones for Genomic Analysis: Approaches and Practical Recommendations

T. V. Andreeva^{a, b, c, *}, A. B. Malyarchuk^a, A. D. Soshkina^a, N. A. Dudko^{a, c},
 M. Yu. Plotnikova^c, and E. I. Rogaev^{c, d, e, **}

^aCenter for Genetics and Genetic Technologies, Faculty of Biology,
 Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

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

^cCenter for Genetics and Life Science, Sirius University of Science and Technology, Sochi, 354340 Russia

^dDepartment of Genetics, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

^eDepartment of Psychiatry, UMass Chan Medical School, Worcester, MA, 01545 USA

*e-mail: andreeva@rogaevlab.ru

**e-mail: rogaev@vigg.ru

The emergence and development of a next generation sequencing methods has opened up new perspectives in the study of ancient organisms, including extinct ones. Bone remains from archaeological and museum collections often can be the only source of information about ancient species and populations. In this review we discuss the features of human bone tissue, and the advantages and disadvantages of bone material as a source of DNA for the genomic analysis of ancient people. Here we present new methodological approaches for DNA extraction from ancient human bone remains and its preparation for large-scale parallel sequencing, as well as prospects in a new interdisciplinary field – paleogenomics.

Keywords: ancient DNA, paleogenetics, bone remains, next generation sequencing (NGS).

ГЕНЫ *MSMEG_1963* И *MSMEG_5597*, НО НЕ *inhA*, РЕГУЛИРУЮТ
УСТОЙЧИВОСТЬ *Mycobacterium smegmatis* К ТРИПТАНТРИНАМ© 2022 г. С. Г. Фролова^{1, 2}, В. Н. Даниленко¹, Д. А. Маслов^{1, *}¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия²Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет),
Московская обл., Долгопрудный, 141701 Россия

*e-mail: maslov_da@vigg.ru

Поступила в редакцию 29.12.2021 г.

После доработки 08.02.2022 г.

Принята к публикации 15.02.2022 г.

Распространение лекарственно-устойчивых штаммов *Mycobacterium tuberculosis* является одной из главных угроз мировому контролю за туберкулезом, требующей постоянной разработки новых противотуберкулезных препаратов (ПТП). Триптантрины – удобные соединения для разработки кандидатов в ПТП, отличающиеся простотой синтеза, низкой токсичностью и активностью как в отношении лекарственно-чувствительных, так и лекарственно-устойчивых штаммов *M. tuberculosis*. Ранее еноил-(ацил-переносающий белок)-редуктаза *InhA* была *in silico* предсказана в качестве возможной биомишени триптантринов, а у спонтанных мутантов *M. smegmatis*, устойчивых к триптантринам, были обнаружены мутации в генах *MSMEG_1963*, *MSMEG_4427* и *MSMEG_5597*. В данной работе методами обратной генетики мы показали, что именно мутации в генах *MSMEG_1963* и *MSMEG_5597* приводят к устойчивости к триптантринам за счет нарушения функции репрессии транскрипции кодируемых ими белков. Установлено, что мутации в генах *MSMEG_1963* и *MSMEG_5597* приводят к сверхэкспрессии генов *MSMEG_1964* и *MSMEG_5596* соответственно, кодирующих ферменты, вероятно принимающие участие в окислительно-восстановительной инактивации триптантринов. Также установлено, что *InhA* не является мишенью триптантринов, поскольку его сверхэкспрессия не влияет на чувствительность микобактерий к ним.

Ключевые слова: *Mycobacterium smegmatis*, туберкулез, триптантрин, лекарственная устойчивость, *InhA*.

DOI: 10.31857/S0016675822090089

Mycobacterium tuberculosis – инфекционный агент, вызывающий самое смертоносное бактериальное заболевание, ежегодно уносящее около 1.4 млн жизней – туберкулез [1].

Стрептомицин – природный антибиотик, производимый бактерией *Streptomyces griseus*, открытый в 1944 г., стал первым противотуберкулезным препаратом (ПТП) и положил начало терапии туберкулеза [2]. После стрептомицина были открыты и другие эффективные ПТП, что в итоге привело к разработке шестимесячного курса терапии лекарственно-чувствительного туберкулеза с использованием комбинаций нескольких антибиотиков [3]. Однако нарушения режима приема препаратов в конечном счете приводят к возникновению и распространению штаммов *M. tuberculosis* с множественной (МЛУ) и широкой (ШЛУ) лекарственной устойчивостью. Так, проблема лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* делает необходимым проводить поиск антибиотиков с принципиально новыми механизмами действия. Лекарственная устойчивость *M. tuberculosis* обу-

словлена, как правило, возникновением мутаций в генах, кодирующих мишени ПТП, активаторы пролекарств, белки транскрипционные регуляторы эфлюкса и генов резистоста [4, 5]. В постгеномную эру обязательным этапом поиска новых ПТП является установление биомишеней и механизмов действия кандидатных молекул во избежание развития перекрестной устойчивости. Сам же поиск при этом может идти как от лекарства к мишени, так и от мишени к лекарству [6].

Привлекательным кандидатом для разработки новых ПТП является триптантрин (рис. 1, **1a**), обладающий высокой активностью *in vitro* в отношении *M. tuberculosis*, которая также сохраняется в отношении штаммов с МЛУ (МИК = 1 мкг/мл) [7]. Триптантрин – природный алкалоид, принадлежащий к хиназолиновым антибиотикам, впервые был выделен из растения *Strobilanthes cusia*, Kuntze [8]. Триптантрин обладает широким спектром ингибирующей активности против различных патогенных микроорганизмов, таких как *Leishmania donovani* [9], *Plasmodium falciparum* [10],

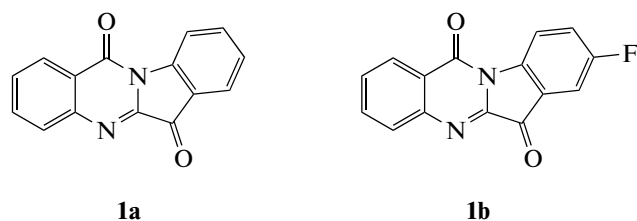


Рис. 1. Структурные формулы триптантрина (**1a**) и 8-фтортриптантрина (**1b**).

Escherichia coli [11], *Helicobacter pylori* [12], а также противогрибковой активностью в отношении родов *Trichophyton*, *Microsporum* и *Epidermophyton* [8, 13]. Ранее исследования с помощью молекулярного докинга показали потенциально высокую аффинность молекулы триптантрина к ферменту еноил-(ацил-переносающий белок)-редуктазе (InhA) *M. tuberculosis* [14]. InhA играет ключевую роль в биосинтезе миколовых кислот, важных компонент клеточной стенки микобактерий, а также является биомишенью ПТП изониазида [15]. Однако, несмотря на исследования *in silico*, биомишень и механизм действия триптантрина еще не были установлены *in vitro*.

Ранее мы показали участие эффлюксной помпы MmpS5-MmpL5 в формировании базового уровня устойчивости *Mycobacterium smegmatis* к триптантрину и 8-фтортриптантрину (рис. 1, **1b**) [16]. Также с использованием штаммов *M. smegmatis mc2 155* (штамм дикого типа) и *M. smegmatis Δmmp5* (штамм с делецией оперона *mmpS5-mmpL5* [17]) нами получены две группы спонтанных мутантов, устойчивых к соединению **1b**. Мутанты также имели перекрестную устойчивость к **1a**, поэтому мы сделали вывод об одинаковом механизме устойчивости *M. smegmatis* к обоим триптантринам **1a** и **1b**. Сравнительный геномный анализ устойчивых мутантов выявил три варианта однонуклеотидных замен в гене *MSMEG_1963* (R893C, R523C, R523L), один вариант мутации в *MSMEG_4427* (L236R), а также инсерцию (Ins50TG), замену (*207R) и инсерцию транспозона в гене *MSMEG_5597* [16]. В данной работе описано исследование участия вышеуказанных генов в формировании механизма устойчивости *M. smegmatis* к триптантринам методами обратной генетики. А также впервые *in vitro* проверена гипотеза о возможной роли InhA в качестве биомишени триптантринов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы и условия культивирования

Штаммы *Escherichia coli DH5α*, используемые для отбора и наработки плазмид, культивировали

в среде LB (Amresco, США). Для культивации штаммов *M. smegmatis* использовали жидкую среду Middlebrook 7H9 (Himedia, Индия) с добавлением OADC (Himedia, Индия), глицерина 0.4% и Tween-80 0.1%, а также триптон-соевый агар (M290, Himedia, Индия) в качестве твердой среды. При необходимости в среду добавляли антибиотик: канамицин 50 мкг/мл, гиромоцин (250 мкг/мл для *E. coli* и 50 мкг/мл *M. smegmatis*) и ангидротетрациклин 10 нг/мл. Инкубировали бактерии в жидкой среде в шейкере-инкубаторе (Infors HT, Базель, Швейцария) при 37°C и 250 об./мин.

Клонирование генов в экспрессионный вектор

Для анализа фенотипа при сверхэкспрессии генов *MSMEG_1963*, *MSMEG_4427*, *MSMEG_5597* (как дикого типа, так и их аллельных вариантов), а также генов *MSMEG_3151* (*inhA M. smegmatis*) и *Rv1484* (*inhA M. tuberculosis*), данные гены были клонированы в составе экспрессионного вектора pMIND [18]. Амплификацию генов проводили при помощи набора Q5 для высокоточной ПЦР (NEB, США). В качестве ДНК-матрицы для амплификации генов дикого типа использовали геномную ДНК *M. smegmatis mc2 155*, а также ДНК *M. tuberculosis H37Rv*, в то время, как для амплификации аллельных вариантов генов *MSMEG_1963*, *MSMEG_4427*, *MSMEG_5597* — геномную ДНК соответствующих мутантных штаммов *M. smegmatis*, описанных ранее [16]. В последовательность праймеров были включены сайты рестрикции *NdeI* и *SpeI*, а также в последовательность прямого праймера — сайт посадки рибосомы перед старт-кодоном. Последовательности праймеров приведены в табл. 1. Полученные ампликоны, а также вектор обрабатывали соответствующими эндонуклеазами рестрикции (NEB, США), после чего лигировали с использованием T4 ДНК-лигазы (Thermo Fisher Scientific, США). Лигазную смесь использовали для трансформации химически-компетентных клеток *E. coli DH5α*, отбор целевых клонов проводили ПЦР-скринингом, после чего подтверждали корректность клонированной последовательности секвенированием по Сэнгеру. Итоговые конструкции использовали для электропорации *M. smegmatis mc2 155* по методике, описанной ранее [19].

Конструирование рекомбинантных штаммов *M. smegmatis*

Для создания штаммов *M. smegmatis*, несущих единичные мутации в генах *MSMEG_1963*, *MSMEG_4427* и *MSMEG_5597* на основе штамма *M. smegmatis mc2 155*, применяли метод гомологичной рекомбинации с использованием суицидной системы p2NIL/pGOAL19 [20]. Вкратце, с использованием набора Q5 для высокоточной ПЦР

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе

ДНК-фрагмент	Праймер	Нуклеотидная последовательность	Сайт рестрикции
Праймеры для клонирования в p2NIL			
HR1963	pN-1963-f3	TTTTGAATCTTAAATTAAGCCGACATCGTCGAGAGTT	<i>EcoRI</i>
	pN-1963-r	TTTTAGTACTTTAATTAAGCGGTAATTTCTGCAGGGAG	<i>ScaI</i>
HR5597	pN-5597-f	TTTTGGATCCGGGTCTCGACTSSAAAAGTCA	<i>BamHI</i>
	pN-5597-r	GCCCTGCAGGAATGCTAGTT	
HR4427	pN-4427-f3	TTTTAAGCTTCTCATCGTCCSAGTTGGCCGG	<i>HindIII</i>
	pN-4427-r3	TTTTGAATCTTAAATTAACCGACTGATTCSSACTTCCCGA	<i>EcoRI</i>
Праймеры для клонирования в pMIND			
<i>MSMEG_3151</i>	pM-3151-f	TTTTCATATGAGGAGGAATTGTTATGACAGGCCCTACTCGAAGGCAA	<i>NdeI</i>
	pM-3151-r	TTTTACTAGTTTCAACAACAGCTGCGTGTGG	<i>SpeI</i>
<i>Rv1484</i>	pM-tb-inha-f	TTTTCATATGAGGAGGAATTGTTATGACAGGACTGCTGGACG	<i>NdeI</i>
	pM-tb-inha-r	TTTTACTAGTCTAGAGCAATTTGGGTGTGCG	<i>SpeI</i>
<i>MSMEG_1963</i>	msmeg-1963-f	TTTTCATATGAGGAGGAATTGTTATGCTCGGACCACTGCAG	<i>NdeI</i>
	msmeg-1963-r	TTTTACTAGTTTCAAGACAGTGAACGGGCCCT	<i>SpeI</i>
<i>MSMEG_5597</i>	msmeg-5597-f	TTTTCATATGAGGAGGAATTGTTATGATGGACGTCATCGCGAGT	<i>NdeI</i>
	msmeg-5597-mut-r	TTTTACTAGTCTACGAGGGCGTCCGAGGAGGAATTTGGCCCGGA	<i>SpeI</i>
	msmeg-5597-r	TTTTACTAGTTTCAAGCGCTTGCCTGCGTGG	<i>SpeI</i>
<i>MSMEG_4427</i>	msmeg-4427-f	TTTTCATATGAGGAGGAATTGTTATGTTGATGTTTGGCCAGCG	<i>NdeI</i>
	msmeg-4427-r	TTTTACTAGTTTCACTGCGGAGGTGACTGTTC	<i>SpeI</i>
Праймеры для ПЦР real-time			
	q_5597_f	TCATCGCGAGTTCGATGTGGACAAG	
	q_5597_r	GGATGAAGTCCATGTAGCGCTCGTA	
	q_5596_f	AGGCTCGACATCCTGTTGAACAAC	
	q_5596_r	GAA GCCGGTTCGGATGAAGACGAT	
	q_1963_f	GTGGTGATCGATGATGTGCAATGGG	
	q_1963_r	ATCGGTCGACAACGACGAGAGC	
	q_1964_f	ACGACACCATCTGATCGTCACCTC	
	q_1964_r	TACCCGACGACACCCACGTT	
	q_sigA_f	CGAGCTTGTGATCACCTCGACCAT	
	q_sigA_r	CTCGACCTCATCCAGGAAGGCAAC	
	q_ftsZ_f	AGCAGCTCCTCGATGTCGTCCCTT	
	q_ftsZ_r	GCCTGAAGGGCGTTCGAGTTTCAT	

(NEB, США), праймеров, содержащих специфичные сайты рестрикции (табл. 1), и геномной ДНК спонтанных мутантов *M. smegmatis*, имеющих целевые мутации [16], были наработаны соответствующие фрагменты, содержащие мутации в целевых генах, а также плечи длиной ~1500 пн для гомологичной рекомбинации (фрагменты HR1963, HR4427 и HR5597). После обработки соответствующими эндонуклеазами рестрикции (Thermo Fischer Scientific, США) ампликонов и плазмиды p2NIL, производили лигирование и отбор целевых клонов по методике, описанной выше. Далее в целевые плазмиды по сайту рестрикции *PacI* клонировали кассету с маркерными генами из плазмиды pGOAL19. Конечными плазмидами электропорировали клетки *M. smegmatis mc2 155*. Отбор единичных кроссоверов проводили на триптон-соевом агаре, содержащем канамицин 50 мкг/мл, гигромицин 50 мкг/мл и X-Gal (50 мкг/мл): плаزمида p2NIL не имеет микобактериального ориджина репликации, таким образом работа маркерных генов возможна только при интеграции плазмиды в хромосому путем гомологичной рекомбинации. Синие колонии единичных кроссоверов растили ночь в жидкой среде Middlebrook 7H9, после чего высевали на триптон-соевый агар, содержащий X-Gal (50 мкг/мл) и 10%-ную сахарозу для отбора двойных кроссоверов, после чего тестировали их чувствительность к канамицину, для подтверждения полного удаления кассеты с маркерными генами из хромосомы. Для конечного отбора рекомбинантов, несущих желаемую однонуклеотидную замену, секвенировали целевую область по Сэнгеру.

Определение минимальной ингибирующей концентрации

Анализ лекарственной чувствительности штаммов микобактерий проводили методом определения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) при серийных микроразведениях. Для определения МИК культуры штаммов *M. smegmatis* инкубировали ночь в жидкой среде Middlebrook 7H9, затем ночные культуры разводили свежей средой 7H9 до $OD_{600} = 0.05$. Далее бактериальные культуры по 196 мкл вносили в 96-луночный планшет, содержащий серийные двукратные разведения соединения **1b** в DMSO, до конечных концентраций от 0.5 до 32 мкг/мл и максимально возможную концентрацию — 53.2 мкг/мл, и для изониазида от 25 до 1600 мкг/мл. Оценку роста клеточных культур проводили визуально после двух суток инкубации при 37°C и периодического помешивания при 250 об./мин. За МИК принимали концентрацию, при которой не наблюдалось визуального роста культуры.

Выделение РНК микобактерий и постановка ПЦР в реальном времени

Для выделения тотальной РНК, культуры *M. smegmatis* растили в 10 мл среды Middlebrook 7H9 до оптической плотности $OD_{600} \approx 1.0$, после чего промывали дважды 3 мл реагента RNeasy Protect Bacteria Reagent (QIAGEN, США). Тотальную РНК микобактерий выделяли при помощи набора RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN, США) по протоколу производителя, с использованием кремниевых шариков Lysing Matrix B (MP Biomedicals, США) для гомогенизации. После выделения и очистки, РНК обрабатывали ДНКазой TURBO DNase (Thermo Fisher Scientific, США), измеряли концентрацию на приборе Qubit (Invitrogen, США) набором RNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США), целостность РНК оценивали при помощи электрофореза в агарозном геле. Синтез первой цепи кДНК проводили набором iScript Select cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, США) с использованием 300 нг тотальной РНК.

Для постановки количественной ПЦР в реальном времени использовали набор qPCR-HS SYBR (Евроген, Россия) и 5 нг кДНК на приборе CFX96 Touch (Bio-Rad, США). Праймеры были подобраны в программе Primer-BLAST [21] и приведены в табл. 1. Оценку результатов проводили в программе CFX Manager V 3.1 (Bio-Rad, США): относительная нормализованная экспрессия была посчитана по трем биологическим повторам как $\Delta\Delta Cq$, с использованием генов *sigA* и *ftsZ* в качестве референса.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Мутации в генах *MSMEG_1963* и *MSMEG_5597* приводят к устойчивости к триптантринам

Участие генов *MSMEG_1963*, *MSMEG_4427* и *MSMEG_5597* в формировании устойчивости *M. smegmatis* к триптантринам проверяли двумя подходами: сверхэкспрессией генов дикого типа и их аллельных вариантов, а также конструированием рекомбинантных штаммов, несущих единичные мутации в указанных генах, с последующей оценкой чувствительности штаммов микобактерий к **1b**. Всего нами было сконструировано девять плазмид для сверхэкспрессии исследуемых генов, а также три рекомбинантных штамма (табл. 2).

Сверхэкспрессия генов *MSMEG_1963*, *MSMEG_4427* и *MSMEG_5597* не влияла на чувствительность *M. smegmatis* к **1b**. Так, МИК **1b** для штаммов со сверхэкспрессией данных генов составлял от 4 до 8 мкг/мл, что лишь на ± 1 шаг отличалось от контроля (пустой вектор pMIND, МИК = 8 мкг/мл) и является погрешностью метода (табл. 3). Также не менялась чувствительность штамма *M. smegmatis 4427c*. При этом для *M. smegmatis 1963c* и *5597c* значения МИК **1b** оказа-

Таблица 2. Штаммы микобактерий и плазмиды, описанные в работе

Штамм <i>M. smegmatis</i>	Описание
<i>mc2 155</i>	Дикий тип
<i>1963c</i>	Рекомбинантный штамм, мутация R523L (CGC>CTC) в гене <i>MSMEG_1963</i>
<i>5597c</i>	Рекомбинантный штамм, мутация *207R (TGA>CGA) в гене <i>MSMEG_5597</i>
<i>4427c</i>	Рекомбинантный штамм, мутация L236R (CTG>CGG) в гене <i>MSMEG_4427</i>
<i>Δmmp5-1</i>	Спонтанный мутант <i>M. smegmatis Δmmp5-1</i> , устойчивый к 8-фтортриптантрину, мутация R523C (CGC>TGC) в гене <i>MSMEG_1963</i> [16]
<i>mc2-10</i>	Спонтанный мутант <i>M. smegmatis mc2 155</i> , устойчивый к 8-фтортриптантрину, мутация R893C (CGT>TGT) в гене <i>MSMEG_1963</i> [16]
Плазида	Описание
pMIND	Пустой экспрессионный вектор
pMIND:: <i>1963wt</i>	pMIND с геном <i>MSMEG_1963</i> дикого типа
pMIND:: <i>1963d1</i>	pMIND с мутантным <i>MSMEG_1963</i> (мутация R523C, CGC>TGC)
pMIND:: <i>1963d6</i>	pMIND с мутантным <i>MSMEG_1963</i> (мутация R523L, CGC>CTC)
pMIND:: <i>1963mc10</i>	pMIND с мутантным <i>MSMEG_1963</i> (мутация R893C, CGT>TGT)
pMIND:: <i>4427wt</i>	pMIND с геном <i>MSMEG_4427</i> дикого типа
pMIND:: <i>4427mc10</i>	pMIND с мутантным <i>MSMEG_4427</i> (мутация L236R, CTG>CGG)
pMIND:: <i>5597wt</i>	pMIND с геном <i>MSMEG_5597</i> дикого типа
pMIND:: <i>5597d10</i>	pMIND с мутантным <i>MSMEG_5597</i> (мутация Stop207R, TGA>CGA)
pMIND:: <i>5597mc8</i>	pMIND с мутантным <i>MSMEG_5597</i> (сдвиг рамки считывания, C49>CTG)
pMIND:: <i>ms3151</i>	pMIND с геном <i>MSMEG_3151 (inhA M. smegmatis)</i>
pMIND:: <i>Rv1484</i>	pMIND с геном <i>Rv1484 (inhA M. tuberculosis)</i>

лись максимально возможными, что подтвердило роль мутаций в этих генах в формировании устойчивости к триптантринам. В то же время, сверхэкспрессия генов *MSMEG_1963* и *MSMEG_5597* в штаммах *M. smegmatis 1963c* и *5597c* соответственно, восстанавливала чувствительность данных штаммов к триптантринам.

Мутации в MSMEG_1963 и MSMEG_5597 приводят к сверхэкспрессии MSMEG_1964 и MSMEG_5596

Гены *MSMEG_1963* и *MSMEG_5597* аннотированы как транскрипционные репрессоры (семейства EmbR и TetR соответственно). Как правило, у бактерий транскрипционные репрессоры регулируют экспрессию близлежащих генов. Нами было проанализировано генетическое окружение данных генов, в котором были обнаружены гены *MSMEG_1964* и *MSMEG_5596*, кодирующие, соответственно, митомидин радикальную оксидазу и оксидоредуктазу, которые могут являться потенциальными инактиваторами триптантринов за счет окислительно-восстановительной модификации их молекул.

Для анализа влияния мутаций в генах *MSMEG_1963* и *MSMEG_5597* на изменение экспрессии *MSMEG_1964* и *MSMEG_5596* проведена количественная ПЦР в реальном времени с использованием кДНК-штаммов *M. smegmatis 1963c* и *5597c*. В штамме *M. smegmatis 5597c* наблюдалось значительное повышение экспрессии генов *MSMEG_5596* и *MSMEG_5597* (рис. 2,а), а в штамме *M. smegmatis 1963c* — лишь гена *MSMEG_1964* (рис. 2,б). Нами также была дополнительно исследована экспрессия генов *MSMEG_1963* и *MSMEG_1964* в двух спонтанных мутантах, устойчивых к 8-фтортриптантрину — *M. smegmatis Δmmp5-1* и *mc2-10* [16]. В обоих случаях также наблюдалась значительная сверхэкспрессия гена *MSMEG_1964*, хотя и ниже, чем в случае штамма *M. smegmatis 1963c* (рис. 2,б), экспрессия гена *MSMEG_1963* также не претерпевала значительных изменений в сравнении с контролем. Таким образом, показано, что мутации в генах *MSMEG_1963* и *MSMEG_5597* приводят к сверхэкспрессии генов *MSMEG_1964* и *MSMEG_5596* соответственно, кодирующих ферменты, которые потенциально могут инактивировать молекулы триптантринов [22].

Таблица 3. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) триптантринов в отношении различных штаммов *M. smegmatis*

Штамм	МИК, мкг/мл
	1b
<i>M. smegmatis mc2 155</i>	4
<i>M. smegmatis 1963c</i>	>53
<i>M. smegmatis 5597c</i>	>53
<i>M. smegmatis 4427c</i>	4
<i>M. smegmatis mc2 155 pMIND</i>	8
<i>M. smegmatis mc2 155 pMIND::1963wt</i>	8
<i>M. smegmatis mc2 155 pMIND::1963d1</i>	8
<i>M. smegmatis mc2 155 pMIND::1963d6</i>	8
<i>M. smegmatis mc2 155 pMIND::1963mc10</i>	4
<i>M. smegmatis mc2 155 pMIND::4427wt</i>	8
<i>M. smegmatis mc2 155 pMIND::4427mc10</i>	8
<i>M. smegmatis mc2 155 pMIND::5597wt</i>	8
<i>M. smegmatis mc2 155 pMIND::5597d10</i>	8
<i>M. smegmatis mc2 155 pMIND::5597mc8</i>	4
<i>M. smegmatis 5597c pMIND</i>	>32
<i>M. smegmatis 5597c pMIND::5597wt</i>	8
<i>M. smegmatis 1963c pMIND</i>	16
<i>M. smegmatis 1963c pMIND::1963wt</i>	4

InhA не является биомишенью триптантринов

Еноил-(ацил-переносающий белок)-редуктаза *InhA* – основная мишень изониазида [15], является предсказанной *in silico* биомишенью триптан-

тринов [14]. Сверхэкспрессия гена, кодирующего биомишень лекарственного препарата, должна приводить к повышению уровня устойчивости бактерии к данному препарату, поскольку равного количества молекул препарата уже не должно хватать для ингибирования увеличенного количества белковых молекул мишени. Таким образом, сверхэкспрессия гена, кодирующего биомишень какого-либо препарата, и исследование чувствительности к нему, является удобным способом проверки гипотезы мишень-специфичности препарата. Чтобы проверить гипотезу о том, является ли *InhA* биомишенью триптантринов, мы получили генетические конструкции на основе вектора *pMIND* для сверхэкспрессии генов, кодирующих данный фермент (как *M. smegmatis*, так и *M. tuberculosis*), в клетках *M. smegmatis mc2 155* (табл. 2).

МИК и **1b** в отношении штаммов *M. smegmatis pMIND::ms3151* и *M. smegmatis pMIND::rv1484* оказались равны 8 мкг/мл и не отличались от МИК **1b** для *M. smegmatis pMIND*, хотя сверхэкспрессия генов *MSMEG_3151* и *Rv1484* ожидаемо приводила к устойчивости к изониазиду, использованному в качестве контроля (табл. 4). Таким образом, *InhA* не является биомишенью триптантринов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Триптантрины являются перспективными молекулами для разработки на их основе новых ПТП, главная черта которых – сохраняющаяся активность в отношении лекарственно-устойчи-

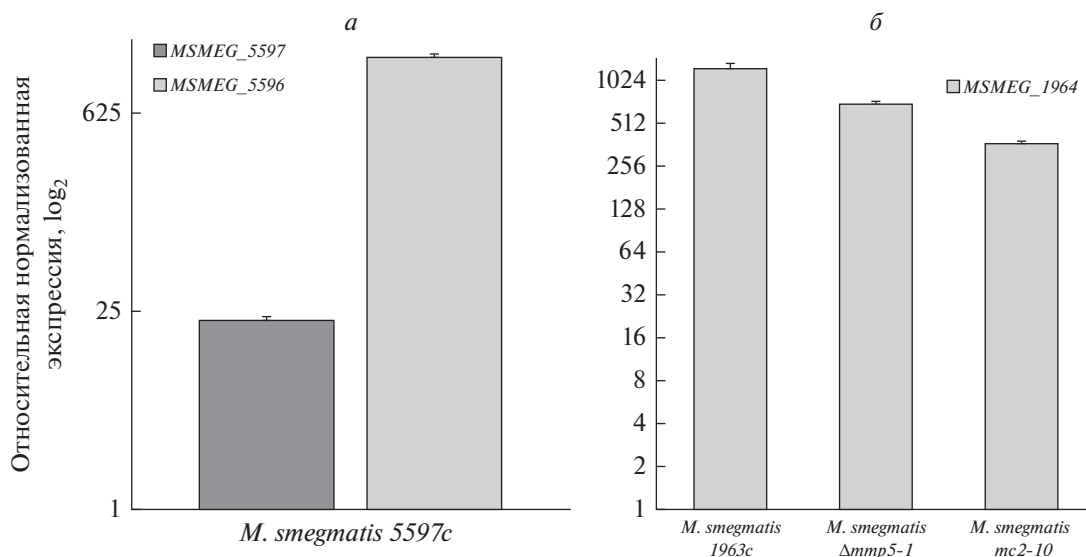


Рис. 2. Относительные уровни экспрессии генов *MSMEG_5597* и *MSMEG_5596* в штамме *M. smegmatis 5597c* (а), и относительные уровни экспрессии гена *MSMEG_1964* в штаммах *M. smegmatis 1963c*, *Δmmp5-1* и *mc2-10* (б). Планки погрешностей отражают стандартную ошибку среднего.

вых штаммов [7]. Основным направлением поиска производных триптантрина является улучшение биодоступности и активности на моделях *in vivo* [22]. Однако несмотря на многочисленные исследования, включающие *in silico* предсказанную биомишень [14], их механизм действия, равно как и механизмы устойчивости микобактерий к ним не подтверждены *in vitro*. Ранее нам удалось показать участие системы эффлюкса MmpS5-MmpL5 в модуляции устойчивости микобактерий к триптантринам, а также обнаружить мутации в трех генах *M. smegmatis* (*MSMEG_1963*, *MSMEG_5597* и *MSMEG_4427*), ассоциированных с устойчивостью к этим соединениям [16], роль каждого из которых предстояло изучить по отдельности.

В данной работе мы показали, что лишь мутации в генах *MSMEG_1963* и *MSMEG_5597* приводят к устойчивости *M. smegmatis* к триптантринам, при этом добавление копии гена дикого типа восстанавливало чувствительный фенотип. Известно, что *MSMEG_1963* и *MSMEG_5597* аннотированы как транскрипционные репрессоры, которые могут регулировать экспрессию близлежащих генов. Мутации в них приводят к нарушению их функции, которая и восстанавливается при гетерологической экспрессии копии данных генов дикого типа. Наши данные подтвердили, что *MSMEG_1963* репрессирует экспрессию *MSMEG_1964* (кодирует митохондриальную радикальную оксидазу), а *MSMEG_5597* — экспрессию *MSMEG_5596* (кодирует оксидоредуктазу). Вероятно, данные ферменты принимают участие в окислительно-восстановительной инактивации триптантринов, приводя к устойчивости при их сверхэкспрессии. Наши данные соответствуют опубликованному ранее [23], согласно которому экспрессия *MSMEG_5596* обратно пропорциональна экспрессии *MSMEG_5597*, однако такой корреляции между экспрессией *MSMEG_1963* и *MSMEG_1964* ранее не наблюдалось, что может быть обусловлено как структурой промотора, так и недостаточным изменением экспрессии гена *MSMEG_1963* в проведенном ранее опыте. В то время как мутации в гене *MSMEG_5597* приводили к масштабным изменениям в структуре белка (сдвиг рамки считывания, замена стоп-кода с удлинением полипептидной цепи, инсерции транспозона), в гене *MSMEG_1963* наблюдались лишь мутации в двух кодонах (523 и 893), хотя и они приводили к существенной сверхэкспрессии контролируемого им гена. Интересно, что обе эти мутации находятся за пределами аннотированного ДНК-связывающего домена (2-247), а кодон 523 является частью аннотированного АТФазного домена белка. Также, по всей видимости, замены в кодоне 523 критичнее для функционирования белка *MSMEG_1963*, так как мутации в этой позиции приводили к более высокому уровню экспрессии *MSMEG_1964*, хотя и не сказывались на уровне устойчивости. Таким образом, более детальное

Таблица 4. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) 8-фтортриптантрина (**1b**) и изониазида (**INH**) в отношении штаммов *M. smegmatis*, сверхэкспрессирующих гены *inhA*

Штамм <i>M. smegmatis</i> mc2 155	МИК, мкг/мл	
	1b	INH
pMIND	8	400–800
pMIND:: <i>ms3151</i>	8	>1600
pMIND:: <i>Rv1484</i>	8	800

изучение структуры белка *MSMEG_1963* может представлять интерес для будущих исследований.

Ген *MSMEG_4427*, аннотированный как транспортер семейства MFS, не влияет на устойчивость *M. smegmatis* к триптантринам. Данная мутация была выявлена только у спонтанных мутантов, полученных с использованием штамма дикого типа *M. smegmatis* mc2 155, помимо этого мутанты также одновременно имели мутации в гене *MSMEG_1963* либо в *MSMEG_5597* [16]. Поэтому изначально не было ясно, вносит ли какой-то вклад *MSMEG_4427* в устойчивость к триптантринам.

Важным результатом является опровержение того, что *InhA* — возможная мишень триптантринов: сверхэкспрессия генов *inhA* как *M. smegmatis*, так и *M. tuberculosis* не влияла на чувствительность *M. smegmatis* к триптантринам, хотя повышала устойчивость к изониазиду в случае гена *inhA M. smegmatis*. Возможно, *InhA M. tuberculosis* не компенсирует функцию своего гомолога, ингибируемого изониазидом, либо же транскрипция данного гена без адаптации кодонов не столь эффективна.

Авторы выражают благодарность D.V. Salunke (Department of Chemistry and Centre of Advanced Studies in Chemistry, Panjab University, Индия) и P. Kendrekar (Unit for Drug Discovery Research, Department of Health Sciences, Central University of Technology, ЮАР), за предоставление соединений триптантринов для проведения исследований.

Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации для молодых российских ученых-кандидатов наук МК-797.2020.4.

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

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2020. Geneva, Switzerland, 2020. 232 p.
2. *Hinshaw H.C., Pyle M.M., Feldman W.H.* Streptomycin in tuberculosis // *Am. J. Med.* 1947. V. 2. № 5. P. 429–435.
[https://doi.org/10.1016/0002-9343\(47\)90087-9](https://doi.org/10.1016/0002-9343(47)90087-9)
3. *British Thoracic Society.* A controlled trial of 6 months' chemotherapy in pulmonary tuberculosis final report: Results during the 36 months after the end of chemotherapy and beyond // *Brit. J. Dis. Chest.* 1984. V. 78. P. 330–336.
[https://doi.org/10.1016/0007-0971\(84\)90165-7](https://doi.org/10.1016/0007-0971(84)90165-7)
4. *Hameed H.M.A., Islam M.M., Chhotaray C. et al.* Molecular targets related drug resistance mechanisms in MDR-, XDR-, and TDR-*Mycobacterium tuberculosis* strains // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2018. V. 8. 114.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00114>
5. *Islam M.M., Hameed H.M.A., Mugweru J. et al.* Drug resistance mechanisms and novel drug targets for tuberculosis therapy // *J. Genet. Genomics.* 2017. V. 44. № 1. P. 21–37.
<https://doi.org/10.1016/j.jgg.2016.10.002>
6. *Coxon G.D., Cooper C.B., Gillespie S.H., McHugh T.D.* Strategies and challenges involved in the discovery of new chemical entities during early-stage tuberculosis drug discovery // *J. Infect. Dis.* 2012. V. 205. Suppl. 2. P. S258–264.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jis191>
7. *Mitscher L.A., Baker W.* Tuberculosis: A search for novel therapy starting with natural products // *Med. Res. Rev.* 1998. V. 18. № 6. P. 363–374.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-1128\(199811\)18:6<363::aid-med1>3.0.co;2-i](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-1128(199811)18:6<363::aid-med1>3.0.co;2-i)
8. *Honda G., Tabata M.* Isolation of antifungal principle tryptanthrin, from *Strobilanthes cusia* O. Kuntze // *Planta Med.* 1979. V. 36. № 05. P. 85–86.
<https://doi.org/10.1055/s-0028-1097245>
9. *Bhattacharjee A.K., Skanchy D.J., Jennings B. et al.* Analysis of stereoelectronic properties, mechanism of action and pharmacophore of synthetic indolo[2,1-b]quinazoline-6,12-dione derivatives in relation to antileishmanial activity using quantum chemical, cyclic voltammetry and 3-D-QSAR CATALYST procedures // *Bioorgan. Med. Chem.* 2002. V. 10. № 6. P. 1979–1989.
[https://doi.org/10.1016/s0968-0896\(02\)00013-5](https://doi.org/10.1016/s0968-0896(02)00013-5)
10. *Bhattacharjee A.K., Hartell M.G., Nichols D.A. et al.* Structure-activity relationship study of antimalarial indolo[2,1-b]quinazoline-6,12-diones (tryptanthrins). Three dimensional pharmacophore modeling and identification of new antimalarial candidates // *Eur. J. Med. Chem.* 2004. V. 39. № 1. P. 59–67.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2003.10.004>
11. *Bandekar P.P., Roopnarine K.A., Parekh V.J. et al.* Antimicrobial activity of tryptanthrins in *Escherichia coli* // *J. Med. Chem.* 2010. V. 53. № 9. P. 3558–3565.
<https://doi.org/10.1021/jm901847f>
12. *Kataoka M., Hirata K., Kunikata T. et al.* Antibacterial action of tryptanthrin and kaempferol, isolated from the indigo plant (*Polygonum tinctorium* Lour.), against *Helicobacter pylori*-infected mongolian gerbils // *J. Gastroenterol.* 2001. V. 36. № 1. P. 5–9.
<https://doi.org/10.1007/s005350170147>
13. *Honda G., Tosirisuk V., Tabata M.* Isolation of an anti-dermatophytic, tryptanthrin, from indigo plants, *Polygonum tinctorium* and *Isatis tinctoria* // *Planta Med.* 1980. V. 38. № 03. P. 275–276.
<https://doi.org/10.1055/s-2008-1074877>
14. *Tripathi A., Wadia N., Bindal D., Jana T.* Docking studies on novel alkaloid tryptanthrin and its analogues against enoyl-acyl carrier protein reductase (InhA) of *Mycobacterium tuberculosis* // *Indian J. Biochem. Biophys.* 2012. V. 49. № 6. P. 435–441.
15. *Banerjee A., Dubnau E., Quemard A. et al.* *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis* // *Science.* 1994. V. 263. № 5144. P. 227–230.
16. *Frolova S.G., Klimina K.M., Kumar R. et al.* Identification of mutations conferring tryptanthrin resistance to *Mycobacterium smegmatis* // *Antibiotics.* 2021. V. 10. № 1. P. 6–10.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics10010006>
17. *Шур К.В., Фролова С.Г., Акимова Н.И. и др.* Тест-система для *in vitro* скрининга кандидатов в антими-кобактериальные препараты на устойчивость, опосредованную MmpS5-MmpL5-транспортера-ми // *Генетика.* 2021. Т. 57. № 1. С. 108–111.
<https://doi.org/10.31857/s001667582101015x>
18. *Blokpoel M.C.J.* Tetracycline-inducible gene regulation in mycobacteria // *Nucl. Ac. Res.* 2005. V. 8. № 2. P. e22.
<https://doi.org/10.1093/nar/gni023>
19. *Goude R., Parish T.* Electroporation of mycobacteria // *Mycobacteria Protocols. Methods in Mol. Biol. (Methods and Protocols)* / Eds : Parish T., Brown A. Totowa, NJ: Humana Press, 2009. V. 465. P. 203–215.
https://doi.org/10.1007/978-1-59745-207-6_13
20. *Parish T., Stoker N.G.* Use of a flexible cassette method to generate a double unmarked *Mycobacterium tuberculosis* *thyA* *plcABC* mutant by gene replacement // *Microbiology (Reading, England).* 2000. V. 146 (Pt 8). P. 1969–1975.
21. *Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I. et al.* Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction // *BMC Bioinformatics.* 2012. V. 13. № 1. P. 134.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
22. *Hwang J.-M., Oh T., Kaneko T. et al.* Design, synthesis, and structure-activity relationship studies of tryptanthrins as antitubercular agents // *J. Nat. Prod.* 2012. V. 76. № 3. P. 354–367.
<https://doi.org/10.1021/np3007167>
23. *Li X., Mei H., Chen F. et al.* Transcriptome landscape of *Mycobacterium smegmatis* // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. P. 2505.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02505>

***MSMEG_1963* and *MSMEG_5597* Genes, but Not *inhA*, Modulate *Mycobacterium smegmatis* Resistance to Tryptanthrins**

S. G. Frolova^{a, b}, V. N. Danilenko^a, and D. A. Maslov^{a, *}

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

^b*Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Moscow oblast, Dolgoprudny, 141701 Russia*

^{*}*e-mail: maslov_da@vigg.ru*

The spread of drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains is a key threat to the global tuberculosis (TB) control, urging the need to constantly develop new anti-TB drugs. Tryptanthrins are perspective molecules for anti-TB drug candidates' development due to their ease of synthesis, low toxicity and antimycobacterial activity on both drug susceptible and drug-resistant *M. tuberculosis* strains. Enoyl-acyl carrier protein reductase InhA has been previously predicted *in silico* as a possible target for tryptanthrins, while spontaneous tryptanthrin-resistant *M. smegmatis* mutants were found to harbor mutations in *MSMEG_1963*, *MSMEG_4427* and *MSMEG_5597* genes. Using the reverse-genetics approaches we demonstrate that mutations in *MSMEG_1963* and *MSMEG_5597* genes lead to a loss of function of their encoded transcriptional repressors and lead to tryptanthrin-resistance. We show that mutations in *MSMEG_1963* and *MSMEG_5597* lead to overexpression of *MSMEG_1964* and *MSMEG_5596*, respectively, which encode enzymes, potentially involved in redox in-activation of tryptanthrins. We also show that InhA is not a biotarget of tryptanthrins, as its overexpression does not affect tryptanthrin-susceptibility of mycobacteria.

Keywords: *Mycobacterium smegmatis*, tuberculosis, tryptanthrin, drug resistance, InhA.

ВИДОФОРМИРУЮЩИЙ *PFNA*-ОПЕРОН БИФИДОБАКТЕРИЙ: МОДУЛИ СЕНСОРНЫХ БЕЛКОВ Pkb2 И FN3, СТРУКТУРА И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ СРЕДИ РАЗНЫХ ВИДОВ И ШТАММОВ БИФИДОБАКТЕРИЙ В МИКРОБИОМЕ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА¹

© 2022 г. В. Н. Даниленко^{1, *}, М. Г. Алексеева¹, Т. А. Кошенко¹,
А. С. Ковтун¹, В. З. Незаметдинова¹

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

*e-mail: valerid@vigg.ru

Поступила в редакцию 22.03.2022 г.

После доработки 31.03.2022 г.

Принята к публикации 05.04.2022 г.

Недавно нами был открыт и исследован видоспецифический (видоформирующий) оперон *PFNA* бифидобактерий. Гены *pkb2* и *fn3* оперона кодируют белки, которые могут участвовать в восприятии сигналов организма хозяина. Было показано, что ген *fn3* кодирует FN3-белок, содержащий два фибронектиновых домена с мотивами цитокиновых рецепторов. Фрагмент этого белка способен селективно связываться с TNF α . Предполагается, что *PFNA*-оперон *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* GT15 контролирует двунаправленную коммуникацию с элементами (цитокинами) иммунной системы человека. В данной работе с использованием баз данных секвенированных геномов видов бифидобактерий – обитателей микробиоты желудочно-кишечного тракта человека, исследовали внутривидовой полиморфизм сенсорного C-концевого домена Pkb2 (SCD Pkb2 – sensor C-end domain) и фрагмента белка FN3, содержащего два FN3-домена (2D FN3). В изучаемых доменах каждого из восьми исследованных видов бифидобактерий различного географического происхождения обнаружены значимые неповторяющиеся аминокислотные замены, позволяющие выделить от двух до пяти групп у каждого вида бифидобактерий. С использованием программы trRosetta показано, что обнаруженные замены аминокислот могут приводить к изменению 3D-структур анализируемых доменов. Предполагается, что обнаруженная кластеризация штаммов может отражать гетерогенность в популяциях бифидобактерий у людей, из которых они были выделены, по иммунному статусу. Сформированы каталоги белков SCD Pkb2 и 2D FN3, включающие значимые замены аминокислот у восьми исследуемых видов, относящихся к четырем филогенетическим группам: *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. longum* и *B. pseudolongum*. С использованием ранее разработанных алгоритмов и созданного каталога установили встречаемость исследуемых групп штаммов в метагеномах здоровых жителей Москвы двух возрастных групп: дети 3–5 лет и взрослые старше 18 лет. Разработанный подход предполагается использовать для изучения корреляции различного иммунного статуса и наличия в микробиоте штаммов бифидобактерий, принадлежащих к конкретным группам, кластеризованным по заменам аминокислот в SCD Pkb2 и 2D FN3.

Ключевые слова: микробиом кишечника, бифидобактерии, *PFNA*-оперон, SCD Pkb2-сенсорный белок, 2D FN3-сенсорный белок, рецепторы элементов иммунной системы.

DOI: 10.31857/S0016675822090077

Бифидобактерии – анаэробные бактерии, существовавшие на планете Земля до появления на ней кислорода и после его появления, заселившие анаэробные полости практически всех представителей животного мира от насекомых до человека [1–3]. Род *Bifidobacterium* насчитывает 99 видов, одиннадцать из которых встречаются в ЖКТ чело-

века [3, 4]. Человеческие виды бифидобактерий относятся к четырем филогенетическим группам: *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. pseudolongum* [3]. Частоты встречаемости разных видов у человека существенно различаются. Также различаются частоты встречаемости одного и того же вида у детей и взрослых [5–7]. Бифидобактерии участвуют в формировании иммунной системы своих хозяев [8–10]. Хорошо известно, что подвид *B. longum* subsp. *infantis* и вид *B. bifidum* первыми после рождения заселяют кишечник человека и форми-

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0016675822090077 для авторизованных пользователей.

руют иммунную систему ребенка [7, 11]. Интенсивно исследуется роль бифидобактерий и их компонентов (метаболитов) в коммуникации кишечника—мозг и кишечник—иммунная система [12, 13]. Относительно хорошо изучены метаболиты и компоненты клеток бифидобактерий, модулирующие с помощью тех или иных механизмов активность иммунной системы [14, 15]. Вместе с тем, практически ничего не известно о сигнальных системах (белках, рецепторах и др.), способных воспринимать сигналы иммунной системы, в том числе осуществлять взаимодействия с цитокинами [9, 16, 17].

Ученые лаборатории генетики микроорганизмов ИОГен РАН открыли и исследовали видоспецифический оперон *PFNA* бифидобактерий, ответственный за такие взаимодействия [18, 19]. Оперон *PFNA* встречается в геномах большинства видов бифидобактерий [13], включая 11 видов, встречающихся у человека. В состав оперона входят пять основных генов: *pkb2*, *fn3*, *aaa-atp*, *duf58*, *tgm*. Серин-треониновая протеин киназа Pkb2, кодируемая геном *pkb2*, является белком сигнальной трансдукции и состоит из N-концевого внутриклеточного домена и C-концевого сенсорного внеклеточного домена (SCD), способного связываться с сигналом внешней среды (лигандом). На данный момент лиганд неизвестен, и его идентификация является важной научной и практической задачей. Ген *fn3* кодирует FN3-белок, содержащий два фибронектиновых домена с мотивами цитокиновых рецепторов. Впервые в мире нами было показано, что фрагмент FN3-белка способен селективно связываться с фактором некроза опухоли TNF α [17].

В статье представлены результаты исследований полиморфизма SCD Pkb2 и фрагмента белка FN3, содержащего два FN3-домена (2D FN3), с целью выявить основные группы аминокислотных замен, получить прогноз влияния замен на пространственные структуры доменов, а также определить встречаемость различных групп аминокислотных замен в метагеномах российских жителей (детей и взрослых).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поиск последовательностей доменов сенсорных белков SCD Pkb2 и 2D FN3 в метагеномных данных

Полные метагеномы для проведения биоинформатического анализа были получены нами и внесены в базу данных NCBI SRA ранее, в рамках реализации проектов РФФИ № 17-15-01488 и № 20-14-00132. Всего в анализируемое множество вошло 23 метагенома микробиоты кишечника здоровых детей в возрасте 3–5 лет (идентификационный номер в базе данных NCBI SRA – PRJNA516054) и 38 метагеномов микробиоты кишечника здоровых

взрослых людей (PRJNA762199). Отбор здоровых детей и взрослых проводился среди жителей г. Москвы. В группы включались добровольцы, соответствующие следующим критериям: отсутствие психиатрического заболевания, отсутствие острых инфекционных заболеваний и хронических аутоиммунных заболеваний, отсутствие соматических заболеваний, способных повлиять на результаты молекулярного тестирования (например, ВИЧ, рак, диабет), прием курса антибиотиков не позднее трех месяцев до даты взятия фекальных проб, хронический прием антибиотиков. Оценка психологического здоровья детей проводилась в соответствии с диагностическим и статистическим руководством по психическим расстройствам пятого издания (DSM-V), а взрослых – в соответствии с опросником центра эпидемиологических исследований (CES-D) и опросником генерализированного тревожного расстройства (ГТР-7). Оценка качества метагеномных чтений была проведена при помощи программы FastQC версии 0.11.9 [20], а исправление ошибок секвенирования и удаление адаптеров – при помощи Trimmomatic версии 0.39 [21]. Далее чтения были собраны в контиги с использованием metaSPAdes версии 3.14.1 [22]. Поиск аминокислотных последовательностей доменов сенсорных белков SCD Pkb2 и 2D FN3 из соответствующих каталогов выполнялся в контигах программой BLASTx версии 2.10.1 [23]. Отбор результатов проводился по критериям: гомология между определенной последовательностью и референсом не менее 90%, а длина – не менее 70% от длины референса.

Биоинформатический анализ

Последовательности генов и белков бифидобактерий, обсуждаемые в статье, были получены из базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). В работе использовали следующие программы: BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) для выявления полиморфизма аминокислотных последовательностей; Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) для множественных выравниваний аминокислотных последовательностей; SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) для идентификации доменов белков FN3; Phobius (<https://phobius.sbc.su.se/>) для идентификации трансмембранных доменов белка Pkb2 (TM-домен); trRosetta (<https://yanglab.nankai.edu.cn/trRosetta/>) для предсказания пространственных структур фрагментов белков [24]. В качестве референтных штаммов конкретных видов бифидобактерий для распределения по группам аминокислотных замен использовались либо типовые штаммы, либо выделенные нами лабораторные штаммы с секвенированным геномом: *B. longum* subsp. *longum* GT15 [25] и *B. angulatum* GT102 [26]. Позиции

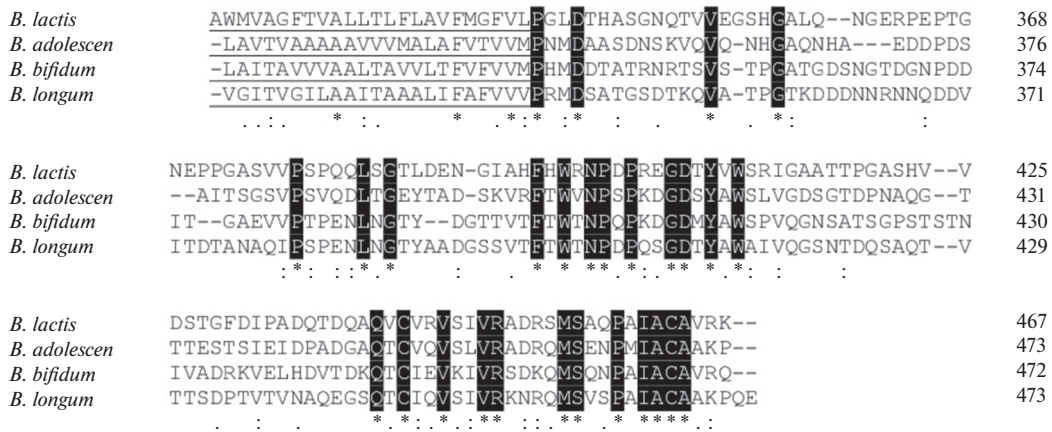


Рис. 1. Выравнивание последовательностей TM и SCD Pkb2 между филогенетическими группами с использованием одного часто встречающегося в микробиоте человека представителя каждой группы. TM-домен отмечен шрифтом с подчеркиванием. Коровые аминокислоты SCD Pkb2 указаны белыми буквами на черном фоне и звездочкой под строкой. Обозначения видов: *B. lactis* — *B. animalis* subsp. *lactis* DSM10140; *B. adolescent* — *B. adolescentis* ATCC 15703; *B. bifidum* — *B. bifidum* PRL 2010; *B. longum* — *B. longum* subsp. *longum* GT15.

аминокислот и аминокислотных замен указаны по полной последовательности Pkb2.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Анализ сенсорных последовательностей белков Pkb2 бифидобактерий человека

1.1. Идентификация коровых аминокислот в последовательностях SCD Pkb2 у видов бифидобактерий, выделенных из микробиоты человека. Протяженность белка Pkb2 у изучаемых видов бифидобактерий человека составляет от 376 до 492 а.о.; N-концевой каталитический домен от 314 до 348 а.о.; TM-домен 20–25 а.о.; SCD 120–135 а.о. (Приложение, табл. 1). Аминокислотные последовательности Pkb2 практически идентичны у штаммов внутри вида и сильно дивергированы между видами [13, 19].

Для сравнения последовательностей TM и SCD Pkb2 были выбраны по одному виду бифидобактерий из каждой филогенетической группы, которые часто встречаются у человека и для которых секвенировано не менее 50 геномов: *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. longum* (Приложение, табл. 2). Проведенное множественное выравнивание аминокислотных последовательностей TM и SCD Pkb2 позволило выявить коровые аминокислоты, имеющиеся у SCD Pkb2 всех видов, встречающихся у человека (рис. 1).

1.2. Полиморфизм аминокислотных последовательностей SCD Pkb2 различных видов бифидобактерий, выделенных из микробиоты человека. Анализ проводился для часто встречающихся в микробиоте человека видов и подвидов бифидобактерий: *B. longum* subsp. *longum*, *B. adolescentis*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. bifidum*, *B. pseudocatenulatum*, и для

редко встречающегося у человека вида *B. angulatum*, а также для *B. longum* subsp. *infantis*, который часто встречается только у младенцев [27, 28]. Учитывались только замены, часто встречающиеся в базе данных секвенированных геномов (5 и более раз). У большинства штаммов подвидов *B. longum* subsp. *infantis* и *B. longum* subsp. *longum* изучаемая последовательность Pkb2 идентична референтной последовательности штамма GT15 [25] (группы 1.1 и 2.1) (табл. 1). Большая группа штаммов *B. longum* subsp. *longum* имеют SCD Pkb2, содержащий замену 400 Т→А (группа 1.2). Кроме того, у *B. longum* subsp. *longum* обнаружена небольшая группа из восьми штаммов, содержащая последовательность с заменой 363 N→Т (группа 1.3). Деятнадцать штаммов подвида *B. longum* subsp. *infantis* имеют спорадические замены. Три такие штамма содержат замены четырех коровых аминокислот в сочетании с заменами некоровых аминокислот (табл. 1; группы 2.2, 2.3, 2.4). У других изученных видов замены коровых аминокислот не обнаружены. Последовательности SCD Pkb2 штаммов *B. adolescentis* можно разделить на четыре группы: группа 3.1 — штаммы не содержат аминокислотных замен по сравнению с референтным штаммом ATCC 15703; группа 3.2 — содержат замену 397 S→G; группа 3.3 — содержат замены 353 A→S(+); 397 S→G; группа 3.4 — содержат замены 366 A→T; 397 S→G. Замена 397 S→G, таким образом, встречается у всех штаммов *B. adolescentis*, имеющих замены (группы 3.2, 3.3, 3.4). Последовательности SCD Pkb2 во всех секвенированных геномах *B. angulatum* являются идентичными (группа 4). Штаммы *B. animalis* subsp. *lactis* можно разделить на две группы: у подавляющего большинства штаммов последовательности идентичны референтной последовательности штамма

Таблица 1. Наличие аминокислотных замен в последовательности SCD Pkb2 у видов *Bifidobacterium*, встречающихся в микробиоте человека (по базе данных NCBI)

Вид бифидобактерий (количество секвенированных геномов)	Группа	Количество геномов	Штамм	Pkb2, номер белкового продукта	Наличие замен аминокислот
1. <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> (478 геномов)	1.1	353	GT15	WP_007057781.1	Нет
	1.2	123	ATCC 55813	WP_032746814.1	400 T→A
	1.3	8	JCM 7053	WP_101026033.1	363 N→T
	2.1	29	157F	WP_007057781.1	Нет
2. <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> (48 геномов)	2.2	1	BT1	WP_060620037.1	357 G→R* ; 469 A→S (+)
	2.3	1	LH_665	WP_174774163.1	376 A→V; 388 G→S*
	2.4	1	IN-07	WP_065436081.1	461 V→A; 466 A→T* ; 468 A→E*
	3.1	4	ATCC 15703	WP_011743628.1	Нет
3. <i>B. adolescentis</i> (102 генома)	3.2	20	AM34-11	WP_117805832.1	397 S→G
	3.3	31	Km4; 150	WP_038444944.1	353 A→S (+); 397 S→G
	3.4	8	MSK.20.2	WP_217717171.1	366 A→T; 397 S→G
	3.5	10	70B	WP_085407849.1	366 A→T; 397 S→G; 437 S→R
	4	6	GT102	WP_052946515.1	Нет
5. <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (118 геномов)	5.1	94	DSM 10140	WP_004218258.1	Нет
	5.2	11	ATCC 25527	WP_014698127.1	от 9 до 16 спорадических замен
6. <i>B. bifidum</i> (131 геном)	6.1	28	PRL 2010	WP_013389588.1	Нет
	6.2	17	ca_0067	WP_129901282.1	348 T→A
	6.3	22	YIT 10347	WP_230094024.1	463 N→D (+)
	6.4	11	LMG 11583	WP_047298710.1	424 G→V
	6.5	7	85B	WP_047285264.1	406 K→R (+); 433 A→V; 463 N→D (+)
7. <i>B. pseudocatenuatum</i> (140 геномов)	7.1	35	JCM 1200	WP_004221354.1	Нет
	7.2	23	YIT12232	WP_226595471.1	399 S→G
	7.3	7	YIT11027	WP_226590582.1	363 K→E (+)
	7.4	9	CA-C29	WP_065435345.1	399 S→G; 443 K→D

* Полу жирным шрифтом указаны спорадические замены у *B. longum* subsp. *infantis*, совпадающие с коровыми аминокислотами.

DSM10140 (группа 5.1); также выделяется небольшая группа из 11 штаммов (группа 5.2), имеющая в SCD от 9 до 16 спорадических замен. Вид *B. bifidum* разделяется на пять групп: самая многочисленная группа не имеет замен в изучаемом домене (группа 6.1); три небольшие группы — по 10–20 штаммов с одиночными заменами (группы 6.2, 6.3, 6.4) и маленькая группа из семи штаммов, имеющая комбинацию из трех замен (группа 6.5). Штаммы *B. pseudocatenulatum* делятся на группу без замен (группа 7.1) и на три группы (7.2, 7.3, 7.4), имеющие одиночные или двойные замены, самая частая из которых 399 S→G.

Составлен каталог SCD Pkb2 из геномов разных видов бифидобактерий, включающий последовательности, содержащие выявленные аминокислотные замены (Приложение, табл. 3).

1.3. Предполагаемая пространственная структура ТМ и SCD Pkb2 у видов бифидобактерий, выделенных из микробиоты человека. Предсказанные программой trRosetta 3D структуры ТМ и SCD Pkb2 трех основных видов бифидобактерий — обитателей ЖКТ человека: *B. adolescentis*, *B. bifidum* и *B. longum*, оказались похожи. ТМ-домен представляет собой спиральную структуру, а SCD представляет собой комбинацию 5–6 антипараллельных β-слоев (рис. 2,а). SCD Pkb2 у редкого для человека вида *B. angulatum* очень короткий (Приложение, табл. 1), и его пространственная структура существенно отличается (рис. 2,а).

У трех штаммов у *B. longum* subsp. *infantis* обнаружены четыре замены в SCD Pkb2, совпадающие с коровыми аминокислотами Pkb2 у человеческих видов бифидобактерий (табл. 1). Замены коровых аминокислот не встречаются по одиночке, а только в комбинации с другими заменами не коровых аминокислот. Были предсказаны 3D структуры С-концевых доменов этих трех штаммов. Предполагаемая пространственная структура существенно не изменялась (рис. 2,б). Попытка моделировать пространственную структуру SCD Pkb2 у гипотетического штамма с одиночной заменой коровой аминокислоты показала, что структура домена при этом существенно нарушается, что, предположительно, может привести к потере функции.

2. Анализ сенсорных последовательностей 2D FN3-белков PFNA-оперона бифидобактерий — обитателей ЖКТ человека

2.1. Фибронектин-содержащие домены FN3-белков бифидобактерий. FN3-белок, кодируемый геном *fn3 PFNA*-оперона бифидобактерий (рис. 3,а), содержит два фибронектиновых домена типа 3 (домены FN3) [19], локализованных в С-концевой области. Объектами исследования являются белки, содержащие только два фибронектиновых доме-

на, обозначенные нами как 2D FN3. Сенсорная последовательность 2D FN3 штамма *B. longum* subsp. *longum* GT15 состоит из 184 аминокислотных остатков.

2.2. Идентификация коровых аминокислот в сенсорных последовательностях 2D FN3 у референтных штаммов бифидобактерий. Проведено выравнивание последовательностей 2D FN3 из девяти видов бифидобактерий, относящихся к трем филогенетическим группам: группа *B. adolescentis* (*B. adolescentis*, *B. catenulatum* subsp. *catenulatum*, *B. catenulatum* subsp. *kashiwanohense*, *B. dentium*, *B. pseudocatenulatum*); *B. longum* (*B. longum*, *B. breve*, *B. angulatum*) и группа *B. bifidum* (*B. bifidum*) [3]. В качестве референтных штаммов использовались: *B. adolescentis* ATCC 15703, *B. bifidum* LMG 11041, *B. breve* LMG 13208, *B. catenulatum* LMG 11043, *B. catenulatum* subsp. *kashiwanohense* DSM 21854, *B. dentium* JCM 1195, *B. pseudocatenulatum* LMG 10505, *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 [3], *B. longum* subsp. *longum* GT15 [25] и *B. angulatum* GT102 [26].

Выравнивание последовательностей (рис. 4) 2D FN3 показало, что последовательности первого домена имеют большую гомологию, чем последовательности второго домена, выявлены коровые (консервативные) аминокислоты. В первом домене выявлена 31 коровая аминокислота, во втором домене — 10 коровых аминокислот.

Гомология последовательностей 2D FN3 *B. longum* subsp. *longum* GT15 и *B. adolescentis* ATCC 15703 составляет: 62.4% идентичности, 84.5% сходства.

Последовательности 2D FN3 у *B. bifidum* и у *B. angulatum* имеют более существенные отличия от последовательностей других видов бифидобактерий из ЖКТ человека. Гомология данных последовательностей *B. longum* subsp. *longum* GT15 и *B. bifidum* LMG 11041 составляет: 54.6% идентичности, 77.0% сходства; гомология последовательностей 2D FN3 *B. longum* subsp. *longum* GT15 и *B. angulatum* GT102 составляет: 41.1% идентичности, 68.6% сходства.

Ранее нами было выявлено, что мотивы цитоклиновых рецепторов были различны у трех видов бифидобактерий: у *B. longum*: WSXPS и WSXES, у *B. bifidum*: WSXPS и EG-PS, а у *B. angulatum*: WSXYS и SGXQA, что может быть связано с взаимодействием с различными цитокинами [19, 26]. Таким образом, полученные данные совпадают.

2.3. Распределение по группам штаммов внутри каждого из видов бифидобактерий, обитающих в ЖКТ человека. Проведен биоинформатический анализ наличия полиморфизма в сенсорных последовательностях 2D FN3 в секвенированных геномах штаммов бифидобактерий из разных коллекций (в основном зарубежных), выделенных из ЖКТ человека. По результатам данного сравнительного анализа в секвенированных ге-

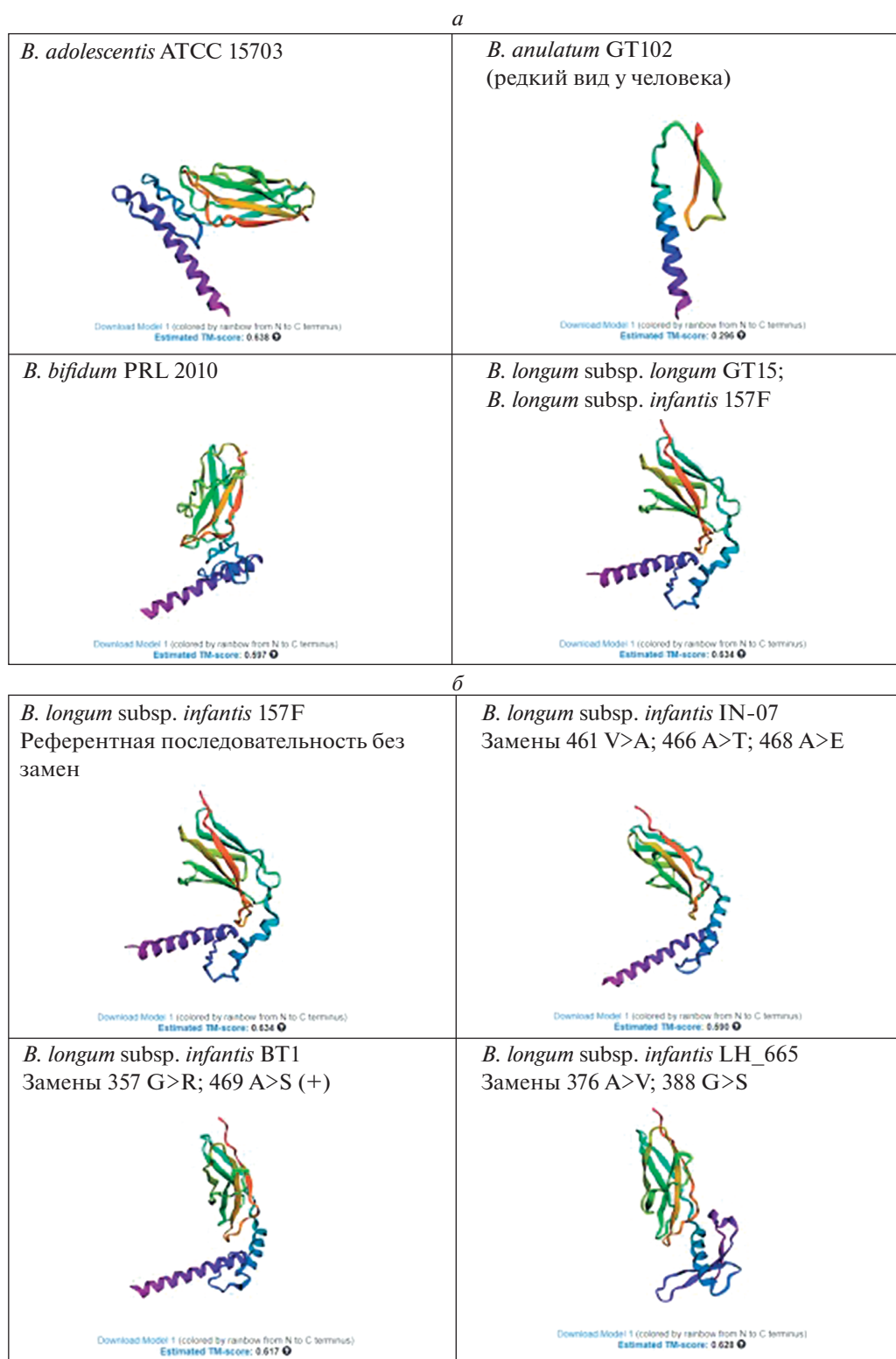


Рис. 2. *a* – предполагаемая пространственная структура ТМ и SCD Pkb2 у видов бифидобактерий, выделенных из микробиоты человека. *б* – предполагаемая пространственная структура ТМ и SCD Pkb2 *B. longum* subsp. *infantis* со спорадическими аминокислотными заменами, совпадающими с коровыми аминокислотами Pkb2.

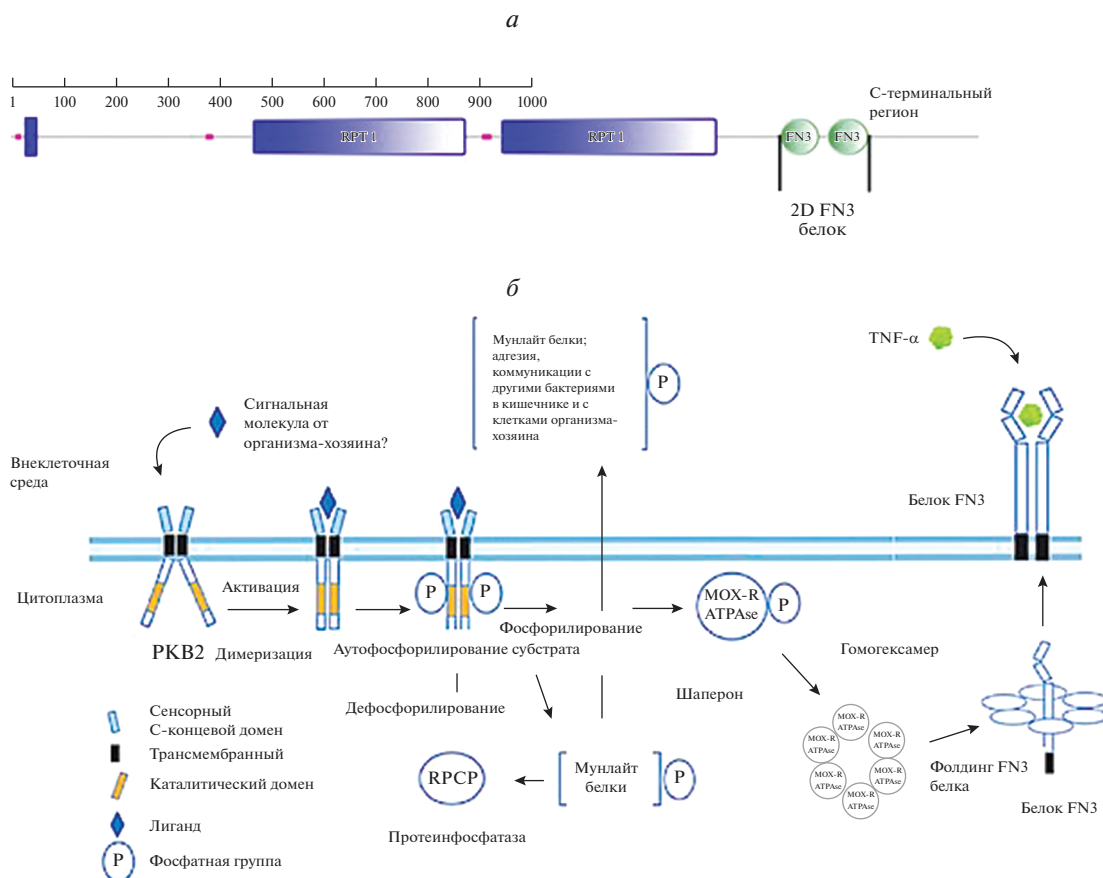


Рис. 3. *a* – белок FN3 штамма *B. longum* subsp. *longum* GT15. Размер белка – 1994 а.о. Доменная структура белка: сигнальный пептид – 1–45 а.о.; трансмембранный регион – 29–51 а.о.; регион RPT1 (1) – 468–885 а.о.; регион RPT1 (2) – 951–1373 а.о.; первый домен FN3 – 1494–1581 а.о.; второй домен FN3 – 1586–1671 а.о.; С-терминальный регион – 1672–1994 а.о. Белок 2D FN3 – 1494–1671 а.о. *б* – гипотетическая схема механизма взаимодействия SCD Pkb2 и 2D FN3 с иммунной системой человека.

номах штаммов *B. longum* subsp. *longum* можно выделить четыре группы (табл. 2): группа 1.1 – не содержат аминокислотных замен по сравнению с референтным штаммом GT15; группа 1.2 – содержат замену 43 А→V; группа 1.3 – содержат две замены 43 А→V и 51 А→Т; группа 1.4 – содержат замену 111 Т→I.

Последовательности 2D FN3 штаммов *B. longum* subsp. *infantis* можно разделить на две группы: группа 2.1 – не содержат аминокислотных замен по сравнению с референтным штаммом ATCC 15697; группа 2.2 – содержат замену 15 N→D.

Последовательности 2D FN3 штаммов *B. adolescentis* можно разделить на четыре группы: группа 3.1 – не содержат аминокислотных замен по сравнению с референтным штаммом ATCC 15703; группа 3.2 – содержат замену 154 F→S; группа 3.3 – содержат две замены 123 N→D и 154 F→S; группа 3.4 – содержат три замены 123 N→D, 150 N→D и 154 F→S.

Последовательности 2D FN3 штаммов *B. angulatum* можно разделить на две группы: группа 4.1 –

не содержат аминокислотных замен по сравнению с референтным штаммом GT102; группа 4.2 – содержат три замены 97 Q→H, 170 S→A и 181 S→G. Последовательности 2D FN3 штаммов *B. dentium* можно разделить на две группы: группа 5.1 – не содержат аминокислотных замен по сравнению с референтным штаммом JCM 1195; группа 5.2 – содержат замену 132 D→G. Замены в коровых (консервативных) аминокислотах не обнаружены.

Последовательности 2D FN3 штаммов, относящиеся к видам *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. catenulatum* subsp. *kashiwanohense*, *B. gallicum* и *B. pseudocatenulatum*, не имели аминокислотных замен по сравнению с референтными штаммами LMG 11041, LMG 13208, LMG 11043, DSM 21854, LMG 11596 и LMG 10505 соответственно.

Составлен каталог сенсорных последовательностей 2D FN3 из геномов разных видов бифидобактерий, включающий последовательности, содержащие выявленные аминокислотные замены (табл. 2, Приложение, табл. 4).

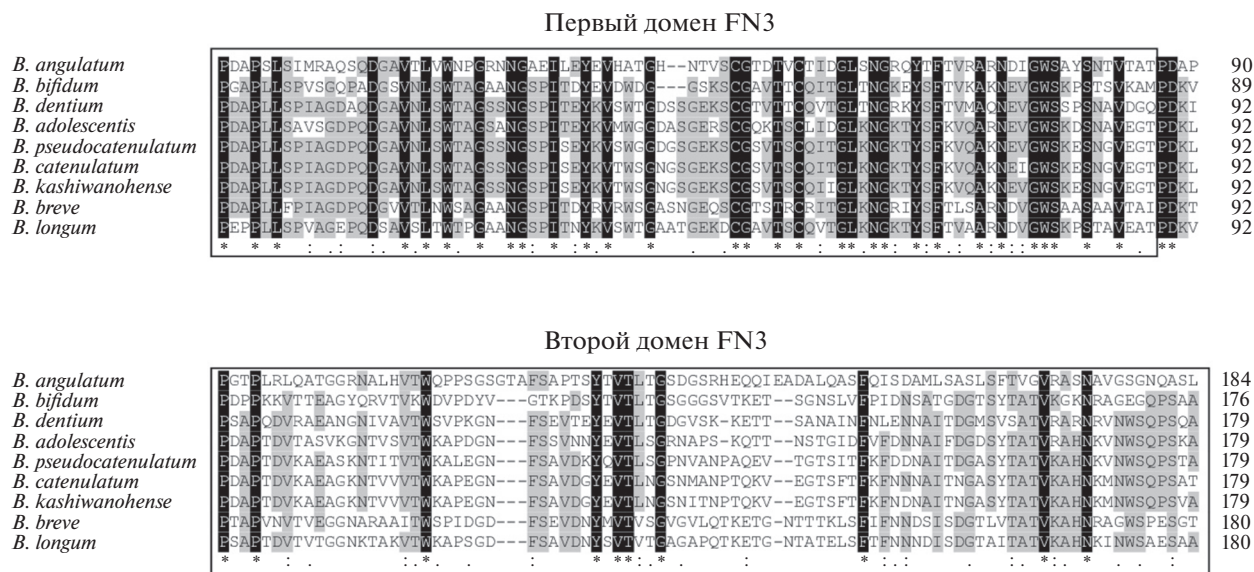


Рис. 4. Выравнивание последовательностей двух FN3-доменов бифидобактерий из ЖКТ человека. Коровые аминокислоты выделены белыми буквами на черном фоне.

2.4. *Предсказание структур белков 2D FN3 B. longum subsp. longum GT15, B. bifidum 791, B. angulatum GT102 и B. adolescentis ATCC 15703.* С использованием Программы trRosetta были предсказаны 3D-структуры 2D FN3-белков штаммов *B. longum subsp. longum* GT15, *B. bifidum* 791, *B. angulatum* GT102 и *B. adolescentis* ATCC 15703 (рис. 5,а). Из рисунка видно, что все фрагменты белков образуют по два структурных элемента для первого и второго доменов FN3, в которых преобладают антипараллельные β -слои. Выявлены структурные отличия для 2D FN3-белков *B. bifidum* 791 и *B. angulatum* GT102 в сравнении со структурой 2D FN3-белка штамма *B. longum* GT15.

Также были выявлены структурные отличия для 2D FN3-белков из четырех групп штаммов *B. longum subsp. longum* (рис. 5,б).

3. Поиск и идентификация в российских метагеномах микробиоты здоровых детей и взрослых последовательностей, кодирующих *SCD Pkb2* и 2D FN3

Последовательности, кодирующие *SCD Pkb2* и 2D FN3, были выявлены в 11 из 23 метагеномов детей и в 34 из 38 метагеномов взрослых. Результаты анализа представлены на рис. 6 (а и б) и в Приложении, табл. 5 и 6. В изучаемых метагеномах не были обнаружены последовательности, соответствующие следующим видам бифидобактерий человека: *B. angulatum*, *B. breve*, *B. catenulatum subsp. kashiwanohense*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. longum subsp. infantis*. В метагеномах детей, кроме того, отсутствовали последовательности, характерные для *B. bifidum* и *B. pseudocatenulatum*.

Анализ встречаемости групп штаммов (табл. 1), несущих аминокислотные замены в *SCD Pkb2*, в метагеномах российских жителей (рис. 6,а, Приложение, табл. 5) показал, что у подвида *B. longum subsp. longum* группа 1.1 очень редко встречается в изучаемых метагеномах и детей, и взрослых, хотя это самая распространенная группа у этого подвида (353 штамма из 535, имеющих секвенированные геномы); группа 1.2 не встречается в изучаемых метагеномах детей и очень редкая у взрослых; очень редкая у иностранных штаммов (8 штаммов из 535) группа 1.3 оказалась самой распространенной (около 55–65%) в изучаемых метагеномах российских жителей (детей и взрослых). У вида *B. adolescentis* группа 3.1 не встречается в исследуемых метагеномах ни у детей, ни у взрослых; является самой редкой группой среди всех известных в мире штаммов *B. adolescentis* (около 4%). Группа 3.2 встречается примерно в 30% изучаемых метагеномов детей и взрослых и у 20% иностранных штаммов; группы 3.3 и 3.4 не встречаются в исследуемых метагеномах детей; группа 3.3 встречается в 20–30% изучаемых метагеномов взрослых россиян и в геномах иностранных штаммов; группа 3.4 довольно редко встречается в метагеномах взрослых и в базах данных (менее 20%); группа 3.5 встречается в изучаемых метагеномах у детей и взрослых, а также у иностранных штаммов, редко (менее 15%). Группа 5.1 *B. animalis subsp. lactis* обнаружена в одном метагеноме ребенка и в двух метагеномах взрослых; группа 5.2 не встречается в изучаемых метагеномах. Группы 6.1, 6.2, 6.3 вида *B. bifidum* редко встречаются у взрослых, а группы 6.4 и 6.5 не обнаружены. У вида *B. pseudocatenulatum*

Таблица 2. Характеристика аминокислотных замен, обнаруженных в сенсорных последовательностях 2D FN3 бифидобактерий из ЖКТ человека

Вид <i>Bifidobacterium</i>	Группы по аминокислотным заменам	Название штамма	Наличие замен аминокислот		Ссылка на GenBank
			первый домен	второй домен	
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	1.1	GT15	Нет	Нет	AIW43408
	1.2	DSM 20219	43 A→V		SEB43038
	1.3	MCC10014	43 A→V 51 A→T		TCD94273
	1.4	MCC10099	Нет	111 T→I	TCF41702
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	2.1	ATCC 15697	Нет	Нет	BAJ69696
	2.2	LH_23	15 N→D		VWQ35166
<i>B. adolescentis</i>	3.1	ATCC 15703	Нет	Нет	BAF40092
	3.2	BIOML-A186		154 F→S	KAB5750345
	3.3	BIOML-A135		123 N→D 154 F→S	KAB5842581
	3.4	BIOML-A120		123 N→D 150 N→D 154 F→S	KAB5869187
<i>B. angulatum</i>	4.1	GT102	Нет	Нет	AMK57067
	4.2	LMG 11039		97 Q→H 170 S→A 181 S→G	KFI41277
<i>B. dentium</i>	5.1	JCM 1195	Нет	Нет	BAQ27672
	5.2	ATCC 27679	Нет	132 D→G	EFM42500

редко встречаются группы 7.2 и 7.3 у взрослых; группы 7.1 и 7.4 не обнаружены у взрослых.

Результат анализа встречаемости групп штаммов (табл. 2), несущих различные аминокислотные замены в сенсорном домене 2D FN3, у различных видов бифидобактерий показан на рис. 6, б и в Приложении, табл. 6. У детей и взрослых были выявлены гены, кодирующие 2D FN3 *B. adolescentis* (группа 3.3, часто встречается в базе данных и в 40% изучаемых метагеномов), *B. longum* subsp. *longum* (группа 1.4, встречается в 25% метагеномов и у 15–20% иностранных штаммов), *B. animalis* subsp. *lactis* и *B. catenulatum* и *B. pseudocatenulatum*. Только у взрослых были выявлены гены, кодирующие 2D FN3 *B. bifidum*, *B. adolescentis* (группа 3.2, встречается в 25% метагеномов, часто встречается в базе данных), *B. longum* subsp. *longum* (группы 1.1 и 1.3). Группа 1.1 встречается в 15% метагеномов взрослых россиян и среди иностранных штаммов. Группа 1.3 обнаружена у 50% штаммов в базе данных и в 30% метагеномов взрослых россиян. В исследуемых метагеномах здоровых детей и взрослых отсутствуют гены, кодирующие 2D FN3 *B. adolescen-*

tis (группы 3.1 и 3.4), *B. longum* subsp. *longum* (группа 1.2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Представленная работа является частью исследований по изучению роли оперона *PFNA* и кодируемых им белков в процессе взаимодействия бифидобактерий с иммунной системой человека.

Анализ аминокислотных последовательностей SCD Pkb2 и 2D FN3 изучаемых видов бифидобактерий человека подтвердил ранее полученные данные [17, 18], что последовательности очень консервативны внутри вида и сильно отличаются у разных видов. Несмотря на сильную межвидовую дивергенцию, у изучаемых видов бифидобактерий человека в последовательностях SCD Pkb2 и 2D FN3 обнаружены консервативные коровые аминокислоты (рис. 1 и 4). По-видимому, коровые аминокислоты важны для образования правильной пространственной структуры доменов, что обеспечивает нормальное функционирование доменов при связывании с лигандом (SCD Pkb2) или компонен-

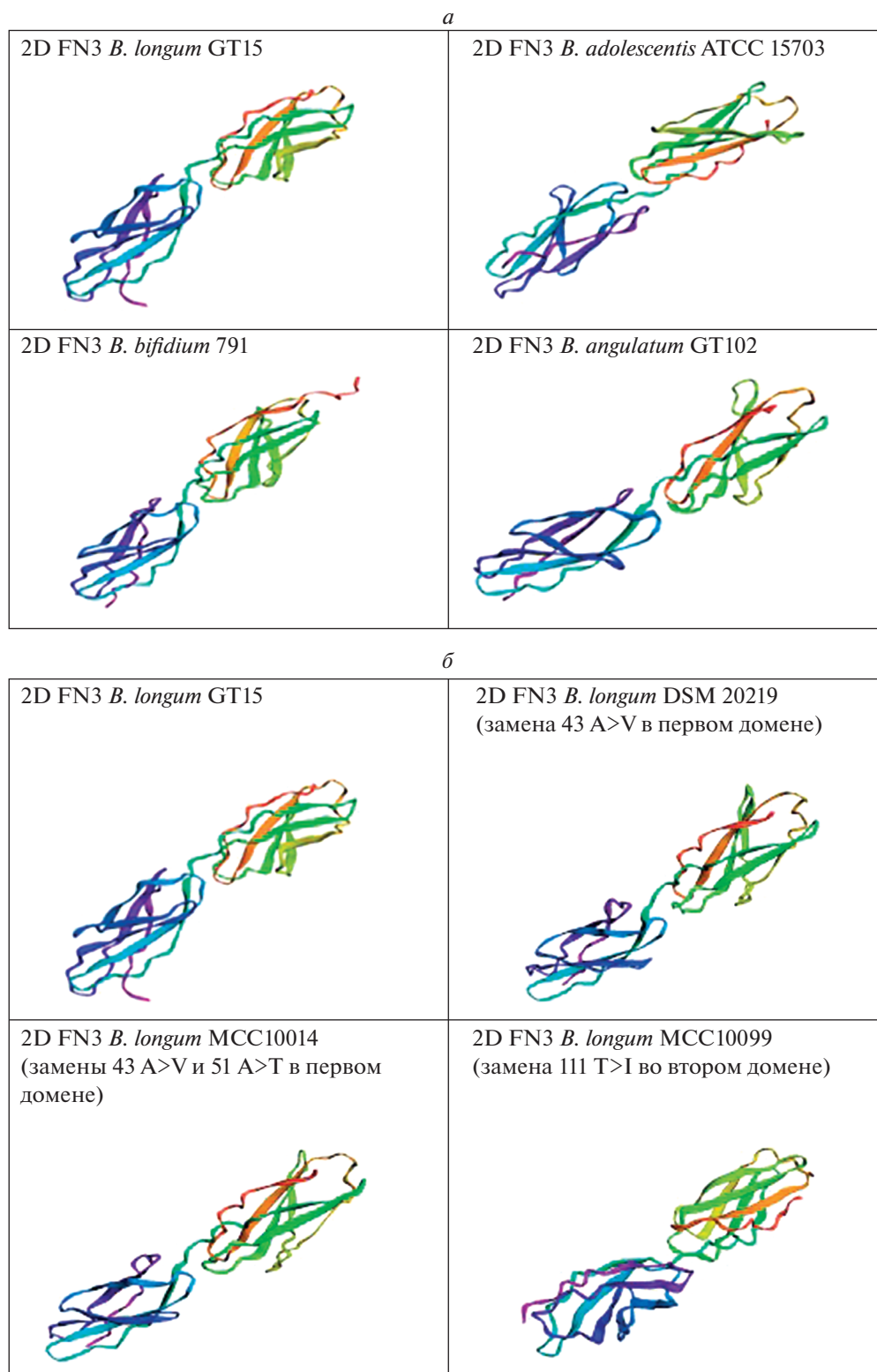


Рис. 5. Предсказание структур фрагментов 2D FN3-белков у бифидобактерий. *a* – структуры 2D FN3-белков штаммов *B. longum* subsp. *longum* GT15, *B. bifidum* 791, *B. angulatum* GT102 и *B. adolescentis* ATCC 15703; *б* – структуры 2D FN3-белков из четырех групп штаммов *B. longum* subsp. *longum*.

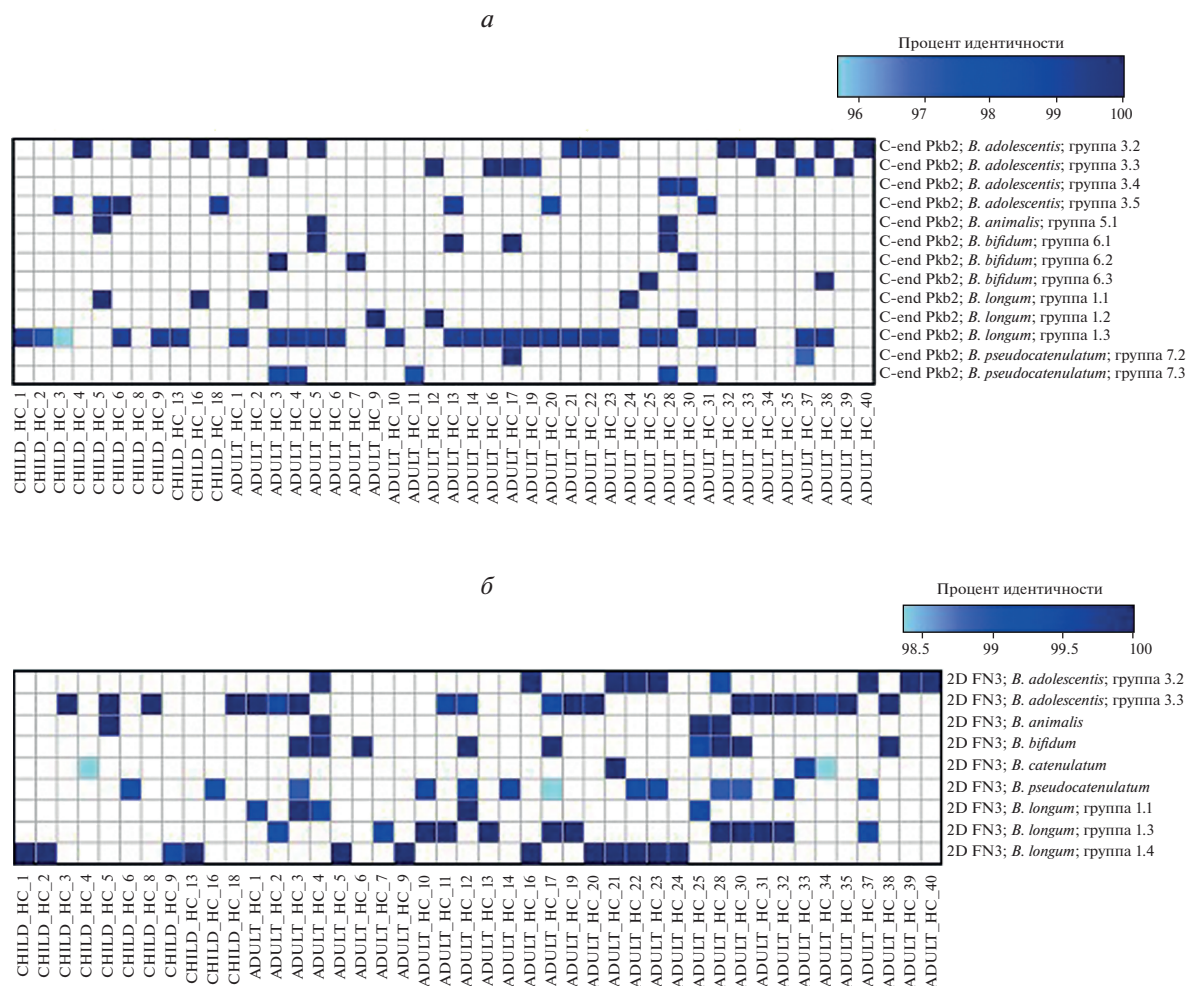


Рис. 6. Результаты поиска последовательностей SCD Pkb2 (а) и 2D FN3-сенсора (б) в микробиоте кишечника здоровых детей (“CHILD_HC”) и взрослых (“ADULT_HC”). На рисунках отражены только образцы, в которых нашлась хотя бы одна исследуемая последовательность, и белки, гомологи которых были выявлены как минимум в двух образцах. Цветовой градиент отображает процент идентичности между оригинальной последовательностью из каталога и найденным гомологом.

тами иммунной системы человека – цитокинами (2D FN3).

Изучение полиморфизма последовательностей SCD Pkb2 и 2D FN3 показало существование часто встречающихся аминокислотных замен, позволяющих внутри каждого изучаемого вида бифидобактерий разделить штаммы на несколько групп (кластеров) (табл. 1 и 2). В случае SCD Pkb2 у подвида *B. longum* subsp. *longum* выявились существенные популяционные различия в частоте встречаемости разных групп аминокислотных замен в российских метагеномах и у штаммов иностранного происхождения (рис. 6,а). Очень редкая в российских метагеномах группа 1.1 (табл. 1) является самой распространенной группой у этого подвида (353 штамма из 535, имеющих секвенированные геномы); очень редкая у иностранных штаммов (8 штаммов из 535) группа 1.3 оказалась самой

распространенной (около 55–65%) в метагеномах российских жителей (детей и взрослых). Возможно, наличие устойчивых кластеризующих замен и частоты их распределения в разных популяциях бифидобактерий связаны со специфичностью взаимодействия SCD Pkb2 с лигандом и 2D FN3 с цитокином и отражают гетерогенность популяции человека по иммунному статусу. Гипотетическая схема механизма взаимодействия SCD Pkb2 и 2D FN3 с иммунной системой человека представлена на рис. 3,б.

Предполагаемые пространственные структуры ТМ и SCD Pkb2 у трех основных видов бифидобактерий – обитателей ЖКТ человека: *B. adolescentis*, *B. bifidum* и *B. longum*, оказались похожи, в то время как у редкого для человека вида *B. angulatum* пространственная структура существенно отличается (рис. 2), что может указывать на воз-

возможность связывания с различными лигандами. Выявлены структурные отличия для 2D FN3-белков *B. bifidum* и *B. angulatum* в сравнении со структурой 2D FN3-белка *B. longum* (рис. 5). Прогностическое построение пространственной структуры 2D FN3 из различных видов бифидобактерий позволило обнаружить в них потенциальные цитокин-связывающие карманы. Аминокислотные замены, особенно замены коровых аминокислот, могут приводить к изменению 3D-структуры доменов, что вызовет изменение специфичности связывания с различными лигандами или изменение эффективности связывания.

Полученные научные результаты помимо фундаментальной значимости представляют большой практический интерес. Различные виды бифидобактерий потенциально могут быть источником белков, селективно связывающихся с про- и противовоспалительными цитокинами человека. Это открывает огромные возможности для создания панели препаратов белков, способных регулировать уровень цитокинов в различных органах и тканях человека, подвергшегося воспалительным процессам.

Работа выполнена в рамках Государственного задания № 0092-2022-003, тема “Механизмы генетических процессов у микроорганизмов, растений, животных и человека”; “Микробиом кишечника человека: иммуномодулирующий и антиоксидантный потенциал”.

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. Gao B., Gupta R.S. Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum *Actinobacteria* // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2012. V. 76(1). P. 66–112. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05011-11>
2. Sun Z., Zhang W., Guo C. et al. Comparative genomic analysis of 45 type strains of the genus *Bifidobacterium*: A snapshot of its genetic diversity and evolution // *PLoS One*. 2015. V. 10(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117912>
3. Duranti S., Longhi G., Ventura M. et al. Exploring the ecology of bifidobacteria and their genetic adaptation to the mammalian gut // *Microorganisms*. 2020. V. 9(1). P. 8. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010008>
4. Lugli G.A., Milani C., Duranti S. et al. Tracking the taxonomy of the genus *Bifidobacterium* based on a phylogenomic approach // *Appl. Environ. Microbiol.* 2018. V. 84(4). <https://doi.org/10.1128/AEM.02249-17>
5. Turroni F., Peano C., Pass D.A. et al. Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota // *PLoS One*. 2012. V. 7(5). P. e36957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036957>
6. Turroni F., Milani C., Duranti S. et al. Glycan utilization and cross-feeding activities by bifidobacteria // *Trends Microbiol.* 2018. V. 26(4). P. 339–350. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.10.001>
7. Wong C., Sugahara H., Odamaki T., Xiao J. Different physiological properties of human-residential and non-human-residential bifidobacteria in human health // *Benef. Microbes*. 2018. V. 9(1). P. 111–122. <https://doi.org/10.3920/BM2017.0031>
8. Averina O.V., Ermolenko E.I., Yu A. et al. Influence of probiotics on cytokine production in the in vitro and in vivo systems // *Med. Immunology*. 2015. V. 17(5). P. 443–454. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2015-5-443-454>
9. Moriel D.G., Heras B., Paxman J.J. et al. Molecular and structural characterization of a novel *Escherichia coli* interleukin receptor mimic protein // *mBio*. 2016. V. 7(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.02046-15>
10. Kumar H., Collado M.C., Wopereis H. et al. The bifidogenic effect revisited: ecology and health perspectives of bifidobacterial colonization in early life // *Microorganisms*. 2020. V. 8(12). P. 1855. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121855>
11. Rabe H., Lundell A.-C., Sjöberg F. et al. Neonatal gut colonization by *Bifidobacterium* is associated with higher childhood cytokine responses // *Gut Microbes*. 2020. V. 12(1). P. 1–14. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1847628>
12. Dogra S.K., Dore J., Damak S. Gut microbiota resilience: definition, link to health and strategies for intervention // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.572921>
13. Shang J., Wan F., Zhao L. et al. Potential immunomodulatory activity of a selected strain *Bifidobacterium bifidum* H3-R2 as evidenced in vitro and in immunosuppressed mice // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02089>
14. Wang Ya., Wu Y., Wang Yu. et al. Antioxidant properties of probiotic bacteria // *Nutrients*. 2017. V. 9(5). P. 521. <https://doi.org/10.3390/nu9050521>
15. Högbom M., Ihalin R. Functional and structural characteristics of bacterial proteins that bind host cytokines // *Virulence*. 2017. V. 8. P. 1592–1601. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1363140>
16. Dyakov I.N., Mavletova D.A., Chernyshova I.N. et al. FN3 protein fragment containing two type III fibronectin domains from *B. longum* GT15 binds to human tumor necrosis factor alpha *in vitro* // *Anaerobe*. 2020. V. 65. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102247>
17. Nezametdinova V.Z., Zakharevich N.V., Alekseeva M.G. et al. Identification and characterization of the serine/threonine protein kinases in *Bifidobacterium* // *Arch. Microbiol.* 2014. V. 196. P. 125–136. <https://doi.org/10.1007/s00203-013-0949-8>

18. *Nezametdinova V.Z., Mavletova D.A., Alekseeva M.G. et al.* Species-specific serine-threonine protein kinase Pkb2 of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*: Genetic environment and substrate specificity // *Anaerobe*. 2018. V. 51. P. 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.03.003>
19. *Nezametdinova V.Z., Yunes R.A., Dukhinova M.S. et al.* The role of the PFNA operon of bifidobacteria in the recognition of host's immune signals: Prospects for the use of the FN3 protein in the treatment of COVID-19 // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22(17). <https://doi.org/10.3390/ijms22179219>
20. *Andrews S.* FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. 2010. Available at <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
21. *Bolger A.M., Lohse M., Usadel B.* Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data // *Bioinformatics*. 2014. V. 30(15). P. 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
22. *Nurk S., Meleshko D., Korobeynikov A., Pevzner P.* MetaSPAdes: A new versatile metagenomic assembler // *Genome Res.* 2017. V. 27(5). P. 824–834. <https://doi.org/10.1101/gr.213959.116>
23. *Boratyn G.M., Camacho C., Cooper P.S. et al.* BLAST: A more efficient report with usability improvements // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt282>
24. *Du Z., Su H., Wang W. et al.* The trRosetta server for fast and accurate protein structure prediction // *Nat. Protoc.* 2021. V. 16(12). P. 5634–5651. <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00628-9>
25. *Zakharevich N.V., Averina O.V., Klimina K.M. et al.* Complete genome sequence of *Bifidobacterium longum* GT15: Identification and characterization of unique and global regulatory genes // *Microb. Ecol.* 2015. V. 70(3). P. 819–834. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0603-x>
26. *Zakharevich N.V., Nezametdinova V.Z., Averina O.V. et al.* Complete genome sequence of *Bifidobacterium angulatum* GT102: Potential genes and systems of communication with host // *Rus. J. Genet.* 2019. V. 55(7). P. 847–864. <https://doi.org/10.1134/S1022795419070160>
27. *Turroni F., van Sinderen D., Ventura M.* Bifidobacteria: insights into the biology of a key microbial group of early life gut microbiota // *Microorganisms*. 2021. V. 7(11). P. 544. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110544>
28. *Dogra S.K., Chung C.K., Wang D. et al.* Nurturing the early life gut microbiome and immune maturation for long term health // *Microorganisms*. 2021. V. 9(10). P. 2110. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102110>

Species-Forming *PFNA* Operon in Bifidobacteria: Modules of Sensor Proteins Pkb2 and FN3, Structure and Distribution among Different Species and Strains of Bifidobacteria Derived from the Human Intestinal Microbiome

V. N. Danilenko^{a,*}, M. G. Alekseeva^a, T. A. Koshenko^a, A. S. Kovtun^a, and V. Z. Nezametdinova^a

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

*e-mail: valerid@vigg.ru

Recently, we discovered and thoroughly interrogated the species-specific (species-forming) *PFNA* operon in bifidobacteria. The *pkb2* and *fn3* making up the operon encode proteins that are possibly involved in the recognition of host signals. The *fn3* gene has been shown to encode a FN3 protein containing two fibronectin domains and cytokine receptor motifs. A fragment of this protein was shown to selectively bind to TNF α . The *PFNA* operon of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* GT15 regulates bidirectional communication with elements (cytokines) of the human immune system. In this study, using databases of sequenced genomes of bifidobacteria isolated from the microbiota of the human gastrointestinal tract, we studied the intraspecific polymorphism of the Pkb2 sensor C-terminal domain (SCD Pkb2-sensor C-end domain) and the FN3 protein fragment containing two FN3 domains (2D FN3). Significant non-recurring amino acid substitutions were found in the studied domains of each of the eight studied species of bifidobacteria of various geographic origins, making it possible to distinguish from 2 to 5 groups in each species of bifidobacteria. Using the trRosetta program, it was shown that the detected amino acid substitutions can lead to changes in the 3D structures of the analyzed domains. It is assumed that the detected clustering of strains may reflect the heterogeneity of Human-derived bifidobacteria, which were isolated from humans with different immune status. Catalogs of SCD Pkb2 and 2D FN3 proteins were put together, including significant amino acid substitutions in eight studied species belonging to four phylogenetic groups: *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. longum* and *B. pseudolongum*. Using the previously developed algorithms and the created catalog, the occurrence of the studied groups of strains in the metagenomes of healthy residents of Moscow was established for two age categories: children 3–5 years old and adults over 18 years old. The developed approach is supposed to be used to study the correlation between the immune status and the presence in the microbiota of bifidobacteria strains belonging to specific groups clustered by amino acid substitutions in SCD Pkb2 and 2D FN3.

Keywords: gut microbiome, bifidobacteria, *PFNA* operon, SCD Pkb2 sensor protein, 2D FN3 sensor protein, receptors of immune system elements.

МИКРОБИОМ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА – РЕЗЕРВУАР АМИНОГЛИКОЗИД-N-АЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗ – ГЕНОВ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ

© 2022 г. М. Г. Алексеева¹ *, Н. В. Захаревич¹, А. В. Ратькин¹, В. Н. Даниленко¹

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

*e-mail: Alekseevamg@mail.ru

Поступила в редакцию 22.03.2022 г.

После доработки 31.03.2022 г.

Принята к публикации 12.04.2022 г.

Микробиом кишечника человека представляет собой сложную экосистему, играющую ключевую роль в поддержании общего гомеостаза, и является динамическим резервуаром генов устойчивости к антибиотикам, которые могут передаваться между бактериями в смешанных популяциях. Одними из основных ферментов, осуществляющих ацетилирование широкого спектра субстратов, являются аминогликозид-N-ацетилтрансферазы (ААС). Ранее у *Enterococcus* и *Staphylococcus* был идентифицирован и охарактеризован бифункциональный фермент ААС(6')-Ie/APH(2'')-Ia, являющийся клинически важным. В рамках данного исследования в секвенированных геномах штаммов, относящихся к *Bacteroides* и *Lactobacillus*, выявлены гены, кодирующие ААС(3). В геномах штаммов, относящихся к большинству видов *Bacteroides*, *Enterococcus* и *Lactobacillus*, выявлены гены, кодирующие Eis (от англ. Enhsnced intracellular survival). Последовательности всех выявленных ААС(3) и Eis не имеют сходства с последовательностями известных ферментов. ААС(3) и Eis у данных бактерий могут иметь разные функции в организме человека, в том числе участвовать в ацетилировании пептидов, белков и других субстратов.

Ключевые слова: микробиом кишечника человека, *Bacteroides*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, аминогликозид-N-ацетилтрансферазы (ААС), белки Eis (белки, повышающие внутриклеточную выживаемость).

DOI: 10.31857/S0016675822090028

Микробиом кишечника человека представляет собой сложную экосистему, играющую ключевую роль в поддержании общего гомеостаза, и является динамическим резервуаром генов устойчивости к антибиотикам. В кишечнике здоровых людей обнаружено около 500 видов микроорганизмов, из них 66 видов являются доминирующими [1, 2]. Лечение с использованием антибактериальных агентов оказывает значительное влияние на резистентности кишечника и приводит к увеличению горизонтального переноса и селекции устойчивых форм. Мощный методологический подход к изучению кишечной микробиоты обеспечивает современный уровень технологии секвенирования геномов [3]. Сравнение последовательностей генов устойчивости показывает, что комменсальные кишечные бактерии могут быть резервуарами генов устойчивости для других видов бактерий (в том числе патогенных для человека) [4].

Устойчивость к аминогликозидным антибиотикам обусловлена наличием в геномах бактерий модифицирующих ферментов, относящихся к трем

подклассам: аминогликозид-N-ацетилтрансферазам (ААС), аминогликозиднуклеотидилтрансферазам (АНТ) и аминогликозидфосфотрансферазам (APH). Аминогликозид-N-ацетилтрансферазы (ААС) катализируют ацетилирование групп NH₂ в молекуле аминогликозидов с использованием ацетилкофермента А. В зависимости от аминокислотной группы антибиотика, модифицируемой ферментом, различают четыре подсемейства ААС: ААС(1), ААС(3), ААС(2') и ААС(6') [5–7].

Наиболее распространенными и исследованными являются ферменты ААС(6'), они присутствуют у грамотрицательных и грамположительных бактерий. Гены, кодирующие эти ферменты, были обнаружены на плаزمиде и хромосомах и/или являются частью мобильных генетических элементов [6, 8]. Ферменты ААС(6') могут существовать в виде слитых белков, занимающих N- или C-концевую область композитного белка. Интересно, что белки, содержащие ферменты подкласса ААС(6')-I, были обнаружены слитыми с APH, ANT или другими ААС. Наиболее хорошо

исследован фермент AAC(6)-Ie/APH(2^{''})-Ia, идентифицированный у *Enterococcus faecalis* и стафилококков [9].

Недавно у *Mycobacterium tuberculosis* был идентифицирован белок, повышающий внутриклеточную выживаемость микобактерий в макрофагах, названный Eis (от англ. Enhanced intracellular survival), который является новым классом AAC, контролирующим выработку провоспалительных цитокинов и способным ацетилировать несколько аминокислот различных аминогликозидных антибиотиков, используя не только ацетил-КоА, но и другие производные этого кофактора [10].

Аминогликозид-N-ацетилтрансферазы, и в частности AAC и Eis, относятся к moonlighting-белкам, т.е. проявляют полифункциональные свойства. Так, у микобактерий AAC вносят частичный вклад в устойчивость к аминогликозидам и связаны с другими бактериальными функциями и способствуют ацетилированию белков клеточной стенки и пептидогликана [10]. Белки Eis обладают способностью ацетилировать не только антибиотики, но и широкий спектр пептидов и белков, включая эукариотические гистоны (в том числе N3-концевой пептид гистона человека H3) [11].

Eis у бактерий представляют собой новый тип арилалкиламин-N-ацетилтрансфераз, поскольку они способны ацетилировать арилалкиламины (например, гистамин, дофамин, октопамин, тирамин, триптамин, норэпинефрин, метокситриптамин, серотонин и 5-гидрокситриптамин), которые являются биологически активными соединениями с различными физиологическими функциями в нервной, нейроэндокринной и иммунной системах человека. Установлено, что Eis *M. tuberculosis* ацетилирует гистамин и октопамин, а Eis *M. smegmatis* использует тирамин и октопамин в качестве субстратов. Ферменты Eis обнаружены также у других бактерий, в основном грамположительных — у *Bacillales*, *Lactobacillales* и *Clostridiales*. У многих бактерий также аннотированы белки с другими функциями, содержащие домены Eis [12].

Известно, что бактерии-комменсалы способны продуцировать различные классы веществ, в том числе ферменты с нейромодулирующей и иммуномодулирующей активностью, поэтому очевидно, что ферменты AAC (в том числе Eis) у бактерий-комменсалов могут играть важную роль во взаимодействиях с организмом хозяина. Однако в современной литературе отсутствуют публикации по идентификации и изучению функций данных ферментов у бактерий-комменсалов микробиоты кишечника человека.

Цель настоящего исследования — биоинформатический анализ распространения генов *aac* в секвенированных геномах основных таксонов бактерий-комменсалов микробиоты кишечника человека *Enterococcus*, *Bacteroides* и более деталь-

ный анализ для представителей рода *Lactobacillus*; сравнение выявленных генов между собой и поиск ближайших гомологов из геномов других бактерий (в том числе патогенных).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биоинформатический анализ. Последовательности генов и белков аминогликозид-N-ацетилтрансфераз *Bacteroides*, *Enterococcus* и *Lactobacillus*, обсуждаемые в статье, были получены из базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Для сравнения их с известными по литературе использовали базу данных неповторяющихся белковых последовательностей (“Non-redundant protein sequences”, NCBI) и программы Blastp [13] и Clustal Omega [14], последнюю для множественного выравнивания белковых последовательностей.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ распространения генов аминогликозид-N-ацетилтрансфераз у Bacteroides

Род *Bacteroides* — одна из преобладающих групп в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) человека. Важность *Bacteroides* дополнительно иллюстрируется тем фактом, что этот род бактерий является наиболее стабильным компонентом желудочно-кишечной микробиоты с течением времени у здоровых взрослых людей.

Первый вид рода *Bacteroides* — *Bacteroides fragilis* был выделен в 1898 г. как человеческий патоген, связанный с аппендицитом. *B. fragilis* является частью нормальной микробиоты толстой кишки человека, однако нарушение поверхности слизистой оболочки способствует распространению *B. fragilis* в кровотоке, что приводит к клинически значимой инфекции [15].

Наиболее часто и в заметном количестве в кишечнике здорового человека обнаруживают следующие виды *Bacteroides*: *B. vulgatus* (*Phocaeicola vulgatus*), *B. dorei* (*Phocaeicola dorei*), *B. uniformis* и *B. ovatus* [16].

Биоинформатический анализ секвенированных геномов штаммов *Bacteroides* для данных видов показал наличие генов, кодирующих аминогликозид-N-ацетилтрансферазы, относящиеся к двум классам: AAC(3) и Eis (табл. 1).

Штаммы, относящиеся к видам *Phocaeicola dorei*, *Bacteroides ovatus* и *Phocaeicola vulgatus*, содержат только по одному гену, кодирующему ацетилтрансферазы Eis. Штаммы, относящиеся к видам *Bacteroides uniformis* и *Bacteroides fragilis*, содержат одновременно по одному гену, кодирующему ацетилтрансферазы AAC(3), и по одному гену, кодирующему ацетилтрансферазы Eis, расположенные в разных генных кластерах.

Таблица 1. Наличие аминокликозид-N-ацетилтрансфераз у видов рода *Bacteroides* (*Phocaeicola*)

Вид	N-ацетилтрансфераза семейства AAC(3)			Eis (N-ацетилтрансфераза семейства GNAT)		
	название штамма	размер, а/к	ссылка на GenBank	название штамма	размер, а/к	ссылка на GenBank
<i>Phocaeicola dorei</i>	Отсутствуют гены, кодирующие AAC			RJX1045	336	TDB22695 E1J03_20575
<i>Bacteroides fragilis</i>	3783N1-6	305	EYB10660 M119_1197	3783N1-6	339	EYB10962 M119_0490
	S24L34	300	EYA78531 M134_4032	S24L34	339	EYA82370 M134_0485
	CL03T12C07	283	QUU02560 INE73_00840	CL03T12C07	339	QUU05501 INE73_03854
<i>Bacteroides ovatus</i>	Отсутствуют гены, кодирующие AAC			am_0171	338	RYT75558 EAJ07_03790
<i>Bacteroides uniformis</i>	AM50-4	308	RGZ49523 DW988_07985	AM50-4	338	RGZ50150 DW988_06155
<i>Phocaeicola vulgatus</i>	Отсутствуют гены, кодирующие AAC			ATCC 8492	336	PQL54778 C5Z04_02675

Штаммы, относящиеся к виду *Bacteroides fragilis*, по наличию гена, кодирующего AAC(3), можно разделить на три группы, кодирующие ферменты размером 305, 300 и 283 а/к. Аминокислотные последовательности Eis из разных штаммов *Bacteroides fragilis* идентичны.

Мы сравнили между собой аминокислотные последовательности Eis из пяти различных видов *Bacteroides*: *Phocaeicola dorei*, *B. fragilis*, *B. ovatus*, *B. uniformis* и *Phocaeicola vulgatus*. Идентичность ацетилтрансферазы Eis из *P. dorei* и из *P. vulgatus* составила 97%. Идентичности ацетилтрансфераз из *B. fragilis*, *B. ovatus* и *B. uniformis* лежат в диапазоне от 55 до 60%. В то же время идентичность между последовательностями ацетилтрансфераз из видов *Phocaeicola* и *Bacteroides* не превышает 43%.

При поиске ацетилтрансфераз, сходных с ацетилтрансферазами из *P. dorei* и *P. vulgatus*, наиболее близкой (идентичность 98–99%) оказалась ацетилтрансфераза из *Niabella* sp. и с более низким процентом идентичности (39–45) были ацетилтрансферазы из видов *Oscillospiraceae bacterium*, *Catenibacterium mitsuokai*, *Escherichia coli* и *Enterobacter hormaechei*.

Niabella sp. также относится к группе *Bacteroides*, *Oscillospiraceae bacterium* – анаэробная бактерия из микробиома человека, *Catenibacterium mitsuokai* – грамположительная анаэробная бактерия, выделенная из фекалий человека, относится к подтипу *Clostridium*. Бактерии *Escherichia coli* и *Enterobacter hormaechei* являются условно-патогенными для человека.

Для ацетилтрансфераз из *B. fragilis*, *B. ovatus* и *B. uniformis* наиболее близкими были те же пять ацетилтрансфераз, только идентичность была чуть выше для четырех (53–68%), а для ацетилтрансферазы из *Niabella* sp. – ниже (42%). При этом последовательность ацетилтрансферазы из *E. hormaechei* была идентична последовательности ацетилтрансферазы из *B. ovatus*, а последовательность ацетилтрансферазы из *C. mitsuokai* была идентична последовательности ацетилтрансферазы из *B. uniformis*.

Анализ распространения генов аминокликозид-N-ацетилтрансфераз у *Enterococcus*

Энтерококки – многочисленная группа условно-патогенных бактерий, в микробиоте ЖКТ человека в основном встречаются виды *Enterococcus faecium* и *Enterococcus faecalis* [17].

Ранее у *Enterococcus* был идентифицирован и охарактеризован бифункциональный фермент AAC(6')-Ie/APH(2")-Ia, являющийся клинически важным, ответственным за высокий уровень устойчивости к аминокликозидным антибиотикам. Этот уникальный фермент с широкой субстратной специфичностью содержит N-концевой домен AAC(6') и C-концевой домен APH(2"); оба домена могут функционировать независимо и посредством ацетилирования и/или фосфорилирования инактивировать большинство аминокликозидных антибиотиков [9].

Нами проведен биоинформатический анализ последовательностей секвенированных геномов штаммов *E. faecalis* и *E. faecium*.

Анализ показал, что все штаммы *E. faecalis* содержат ген, кодирующий бифункциональный фермент AAC(6')-Ie/APH(2")-Ia, а также по два гена, кодирующих аминокликозид-N-ацетилтрансферазы класса Eis. Например, геном штамма *E. faecalis* 1207/14 содержит гены, кодирующие: бифункциональный фермент AAC(6')-Ie/APH(2")-Ia размером 479 аминокислот (а/к) (GenBank: QWW17314.1), Eis размером 403 а/к (GenBank: QWW17706.1) и Eis размером 406 а/к (GenBank: QWW15801.1). Все гены, обнаруженные в штаммах *E. faecalis*, расположены в разных генных кластерах.

Анализ геномов *E. faecium* показал, что все штаммы содержат ген, кодирующий бифункциональный фермент AAC(6')-Ie/APH(2")-Ia, а также один ген, кодирующий AAC(6), и два гена, кодирующих Eis. Все обнаруженные гены расположены в разных генных кластерах в геномах штаммов *E. faecium*. Так, например, геном штамма *E. faecium* U-1313438 содержит гены, кодирующие: бифункциональный фермент AAC(6')-Ie/APH(2")-Ia размером 479 а/к (GenBank: KGQ77505.1), AAC(6) размером 182 а/к (GenBank: KGQ77679.1), Eis размером 393 а/к (GenBank: KGQ77148.1) и Eis размером 406 а/к (GenBank: KGQ76559.1).

Аминокислотные последовательности бифункциональных ферментов AAC(6')-Ie/APH(2")-Ia штаммов *E. faecium* и *E. faecalis* оказались идентичны. Последовательность дополнительного AAC(6) *E. faecium* не имеет сходства с последовательностью бифункционального фермента AAC(6').

Аминокислотные последовательности бифункциональных ферментов AAC(6')-Ie/APH(2")-Ia *E. faecium* и *E. faecalis* также оказались практически идентичны (99%) последовательностям бифункциональных ферментов AAC(6')-Ie/APH(2")-Ia, идентифицированным у патогенных бактерий рода *Staphylococcus*.

Анализ распространения генов аминокликозид-N-ацетилтрансфераз у *Lactobacillus*

Лактобациллы – это широко распространенные бактерии, включающие многие виды и являющиеся одними из наиболее важных компонентов кишечной микробиоты человека, включающие множество пробиотических штаммов, обеспечивающих защиту кишечной флоры от патогенов и стимуляцию иммунной системы. Их широкое использование в пищевой и фармацевтической промышленности продиктовано длительной историей безопасного применения. Однако наличие генов вирулентности и устойчивости к антибиотикам, а также их потенциальная передача патогенным

микроорганизмам представляют риск, который следует учитывать [18].

Известно, что лактобациллы более устойчивы к аминокликозидам и ванкомицину и чувствительны к эритромицину, бета-лактамам антибиотикам, хлорамфениколу и тетрациклину. Результаты анализа бактериальных геномов показали наличие у *Lactobacillus* генов устойчивости к тетрациклину *tet(W)*, наибольшее количество генов устойчивости к антибиотикам было перенесено с мобильными генетическими элементами [19].

Проведенный нами биоинформатический анализ секвенированных геномов штаммов лактобацилл показал наличие генов, кодирующих аминокликозид-N-ацетилтрансферазы, относящиеся к двум классам: AAC(3) и Eis (табл. 2). Идентичность последовательностей AAC из разных штаммов одного вида составляет 98–100%.

Штаммы, относящиеся к видам *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. johnsonii*, *L. paragasseri* и *L. ultunensis*, содержат одновременно по одному гену, кодирующему ацетилтрансферазы AAC(3), и по одному гену, кодирующему ацетилтрансферазы Eis. Данные гены расположены в разных генных кластерах.

Штаммы, относящиеся к виду *L. jensenii*, содержат только по одному гену, кодирующему ацетилтрансферазы AAC(3). Штаммы, относящиеся к видам *L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* и *L. sakei*, содержат только гены, кодирующие ацетилтрансферазы Eis, причем штаммы *L. sakei* содержат два гена, кодирующих Eis размером 403 и 392 а/к.

Штаммы, относящиеся к видам *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. ruminis* и *L. salivarius*, не содержат генов, кодирующих аминокликозид-N-ацетилтрансферазы.

Для подсемейства AAC(3) было идентифицировано одиннадцать подклассов ферментов AAC(3)-I–AAC(3)-XI, гены которых были обнаружены в основном на плазидах или мобильных генетических элементах грамотрицательных клинических изолятов и у продуцентов аминокликозидных антибиотиков. Подкласс AAC(3)-V был исключен после подтверждения того, что единственный фермент в этой группе идентичен AAC(3)-II [5, 7].

Нами не было обнаружено сходства между рассматриваемыми в настоящей работе генами, кодирующими аминокликозид-N-ацетилтрансферазы класса AAC(3), и описанными ранее в литературе генами подсемейства AAC(3). Поэтому мы провели сравнение анализируемых аминокликозид-N-ацетилтрансфераз класса AAC(3) между собой, а также поиск наиболее похожих по аминокислотной последовательности ферментов по базе данных NCBI.

При сравнении ацетилтрансфераз друг с другом была выявлена довольно высокая консерва-

Таблица 2. Наличие аминокликозид-N-ацетилтрансфераз у лактобацилл

Лактобациллы	N-ацетилтрансфераза семейства AAC(3)			Eis (N-ацетилтрансфераза семейства GNAT)		
	название штамма	размер, а/к	ссылка на GenBank	название штамма	размер, а/к	ссылка на GenBank
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	DSM 20079	274	AVW87698 LA20079_08190	DSM 20079	388	AVW86996 LA20079_04400
<i>Lacticaseibacillus casei</i>	Отсутствуют гены, кодирующие AAC			DS1_13	405	PTU95687 DB330_06535
<i>Lactobacillus crispatus</i>	ATCC 33820	271	QWW28104 J6L97_05725	ATCC 33820	388	QWW29972 J6L97_04615
<i>Lactobacillus gasseri</i>	ATCC 33323	272	ABJ60414 LGAS_1039	ATCC 33323	386	ABJ59439 LGAS_0024
<i>Lactobacillus helveticus</i>	LMG 22465	268	GFP05459 LMG22465_14720	LMG 22465	388	GFP05532 LMG22465_15450
<i>Lactobacillus jensenii</i>	DSM 20557	269	KRM51187 FC45_GL000617	Отсутствуют гены, кодирующие аминокликозид-N-ацетилтрансферазу Eis		
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	ATCC 33200	269	KRK56013 FC22_GL000158	ATCC 33200	387	KRK54121 FC22_GL000316
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	Отсутствуют гены, кодирующие AAC			DTA72	405	MXI84121 GRZ59_10270
<i>Lactobacillus paragasseri</i>	JCM 11657	275	GIL32313 PGA11657_02420	JCM 11657	346	GIL32979 PGA11657_09080
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Отсутствуют гены, кодирующие AAC			90sk	393	KIN20067 SC12_09630
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	Отсутствуют гены, кодирующие AAC			K32	405	KFC37507 LRK_00405
<i>Latilactobacillus sakei</i>	Отсутствуют гены, кодирующие AAC			NBRC 3541	403	GEA76977 LSA01_10560
					392	GEA76583 LSA01_06620
<i>Lactobacillus ultunensis</i>	Kx293C1 (DSM 16048)	239	QQP29480 H4B44_05395	Kx293C1 (DSM 16048)	388	QQP29371 H4B44_04780

тивность последовательностей по всей длине (идентичность 70–75%). Исключением стала последовательность *L. jensenii* – при сравнении с другими анализируемыми последовательностями идентичность для нее не превысила 33%. Стоит также отметить, что идентичность между последовательностями видов *L. casei* и *L. paracasei* составила 99%.

При поиске наиболее близких по аминокислотной последовательности ацетилтрансфераз класса AAC(3) в других бактериальных родах наибольший процент идентичности был отмечен для последовательностей ацетилтрансфераз из видов *Bifidobacterium vespertilionis* и *Scardovia wiggisiae* – 41 и 42 соответственно. *B. vespertilionis* – данный вид

бифидобактерий выделен из микробиома млекопитающих. *Scardovia wiggisiae* – патогенная бактерия микробиома полости рта, тесно связанная с кариесом зубов.

Представители нового класса ацетилтрансфераз Eis – ферменты с многофункциональными свойствами, обнаружены относительно недавно и охарактеризованы лишь для ряда патогенных бактерий класса *Mycobacterium*, в том числе для *Mycobacterium tuberculosis*.

Сравнительный анализ ацетилтрансфераз Eis лактобацилл позволил разделить их на пять групп (на основании сходства аминокислотных последовательностей) (рис. 1). Ацетилтрансферазы *L. sakei*_1, *L. rhamnosus*, *L. casei* и *L. paracasei* до-

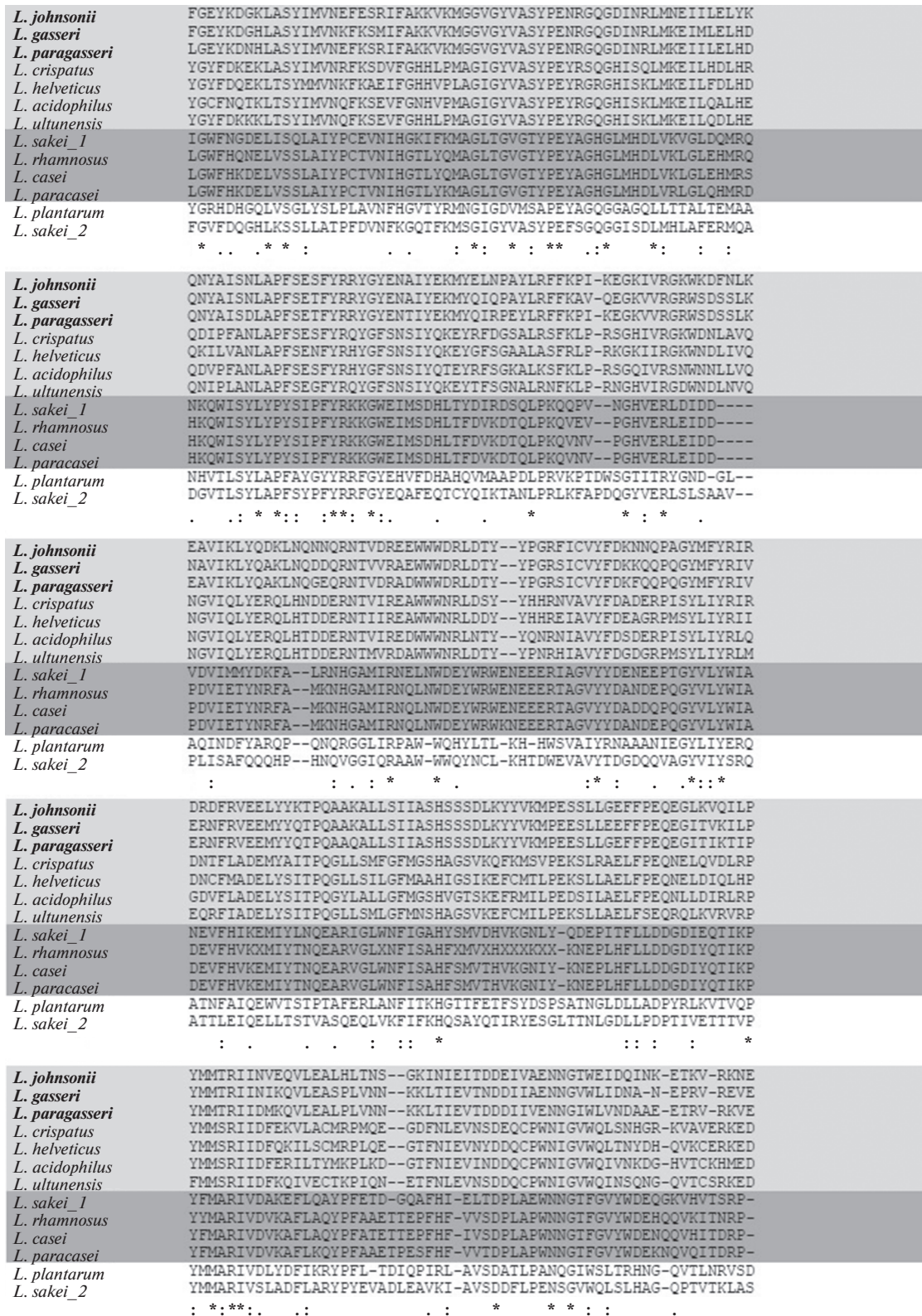


Рис. 1. Множественное выравнивание 13 аминокислотных последовательностей ацетилтрансфераз Eis лактобацилл. Предлагаемые группы выделены фоном, а подгруппы – полужирным шрифтом.

вольно сильно похожи друг на друга и отличаются от остальных, их можно выделить в отдельную группу. Следующие две группы ацетилтрансферазы можно рассматривать либо как самостоятельные, либо как подгруппы одной группы – это *L. johnsonii*, *L. gasseri*, *L. paragasseri* и *L. crispatus*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. ultunensis* (одна из предполагаемых подгрупп выделена полужирным шрифтом). Две оставшиеся ацетилтрансферазы *L. plantarum* и *L. sakei_2* отличаются от всех остальных, но и между собой не так близки, чтобы относить их к одной группе. Сходства с изученными и описанными последовательностями Eis микобактерий найдено не было (идентичность <30% и выравнивание не по всей длине).

ОБСУЖДЕНИЕ

Ферменты с ацетилтрансферазной активностью представляют собой большой класс белков, широко распространенных у организмов из различных экосистем. Происхождение AAC можно проследить по микробным видам, представляющим огромный резервуар для новых, появляющихся ферментов устойчивости, которые в настоящее время недостаточно изучены. Присутствие антибиотик-модифицирующих AAC-ферментов в микробиоме человека необходимо учитывать при разработке новых лекарственных препаратов [18, 19].

Аминогликозид-N-ацетилтрансферазы патогенных бактерий человека зачастую способны проникать в кровяное русло и клетки человека, осуществляя ацетилирование широкого спектра субстратов (т.н. moonlighting-функции). Представители такого класса ацетилтрансфераз Eis – ферменты с многофункциональными свойствами, обнаружены и охарактеризованы относительно недавно и лишь для ряда патогенных бактерий класса *Mycobacterium*, в том числе для *M. tuberculosis*. В то же время первичный биоинформатический анализ показал, что гены, аннотированные как *eis*, широко представлены у других бактерий, в основном грамположительных – у *Bacillales*, *Lactobacillales* и *Clostridiales* [12]. Проведенный нами биоинформатический анализ показал, что у многих бактерий (в том числе бактерий микробиома человека) также аннотированы белки с другими функциями, содержащие домены Eis (неопубликованные данные).

В представленном исследовании был проведен анализ распространения генов аминогликозид-N-ацетилтрансфераз в секвенированных геномах основных таксонов бактерий комменсалов микробиоты кишечника человека. В геномах штаммов, относящихся к *Bacteroides* и *Lactobacillus*, выявлены гены, кодирующие AAC(3). В геномах штаммов, относящихся к большинству видов *Bacteroides*, *Enterococcus* и *Lactobacillus*, выявлены гены, кодирующие Eis.

Последовательности всех выявленных AAC(3) у штаммов *Bacteroides* и *Lactobacillus* не имеют сходства с последовательностями известных ферментов AAC(3)-I–AAC(3)-XI из грамтрицательных клинических изолятов и продуцентов аминокликозидных антибиотиков. Последовательности всех выявленных ферментов Eis у штаммов *Bacteroides*, *Enterococcus* и *Lactobacillus* не имеют сходства с последовательностями Eis патогенных бактерий (*M. tuberculosis*). Наибольшее сходство данные ферменты показывают с ферментами из других комменсальных и условно-патогенных бактерий микробиома человека и млекопитающих (например, с ацетилтрансферазами из *Enterococcus*).

Принимая во внимание тот факт, что бактерии микробиома способны продуцировать различные классы веществ, в том числе с нейромодулирующей и иммуномодулирующей активностью, ферменты AAC(3) и Eis у данных бактерий могут иметь разные функции в организме человека и участвовать в ацетилировании пептидов, белков и других субстратов. В связи с этим изучение функций выявленных AAC(3) и Eis ферментов у *Lactobacillus* и выяснение их возможной роли в коммуникации с организмом человека является темой дальнейших исследований.

Работа выполнена в рамках Государственного задания № 0092-2022-003; тема “Механизмы генетических процессов у микроорганизмов, растений, животных и человека”: “Микробиом кишечника человека: иммуномодулирующий и антиоксидантный потенциал”, подтема “Распространение и функции генов аминогликозид-N-ацетилтрансфераз в микробиоме почв и человека”.

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. Schloissnig S., Arumugam M., Sunagawa S. et al. Genomic variation landscape of the human gut microbiome // Nature. 2013. V. 493. № 7430. P. 45–50. <https://doi.org/10.1038/nature11711>
2. Rajilić-Stojanović M., de Vos W.M. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota // FEMS Microbiol. Rev. 2014. V. 38. № 5. P. 996–1047. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12075>
3. Heintz-Buschart A., Wilmes P. Human gut microbiome: function matters // Trends Microbiol. 2018. V. 26. № 7. P. 563–574. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.11.002>
4. Willmann M., El-Hadidi M., Huson D.H. et al. Antibiotic selection pressure determination through sequence-based metagenomics // Antimicrob. Agents.

- Chemother. 2015. V. 59. № 12. P. 7335–7345.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01504-15>
5. Ramirez M.S., Tolmasky M.E. Aminoglycoside modifying enzymes // Drug. Resist. Updat. 2010. V. 13. № 6. P. 151–171.
<https://doi.org/10.1016/j.drug.2010.08.003>
 6. Ogawara H. Comparison of antibiotic resistance mechanisms in antibiotic-producing and pathogenic bacteria // Molecules. 2019. V. 24. № 19. P. 3430.
<https://doi.org/10.3390/molecules24193430>
 7. Favrot L., Blanchard J.S., Vergnolle O. Bacterial GCN5-related N-acetyltransferases: from resistance to regulation // Biochemistry. 2016. V. 55. № 7. P. 989–1002.
<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01269>
 8. Xu Z., Stogios P.J., Quail A.T. et al. Structural and functional survey of environmental aminoglycoside acetyltransferases reveals functionality of resistance enzymes // ACS Infect. Dis. 2017. V. 3. № 9. P. 653–665.
<https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.7b00068>
 9. Frase H., Toth M., Vakulenko S.B. Revisiting the nucleotide and aminoglycoside substrate specificity of the bifunctional aminoglycoside acetyltransferase (6')-Ie/aminoglycoside phosphotransferase(2'')-Ia enzyme // J. Biol. Chem. 2012. V. 287. № 52. P. 43262–43269.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.416453>
 10. Sanz-García F., Anoz-Carbonell E., Pérez-Herrán E. et al. Mycobacterial aminoglycoside acetyltransferases: A little of drug resistance, and a lot of other roles // Front. Microbiol. 2019. V. 10. P. 46.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00046>
 11. Houghton J.L., Biswas T., Chen W. et al. Chemical and structural insights into the regioversatility of the aminoglycoside acetyltransferase Eis // ChemBiochem. 2013. V. 14. № 16. P. 2127–2135.
<https://doi.org/10.1002/cbic.201300359>
 12. Pan Q., Zhao F.L., Ye B.C. Eis, a novel family of arylalkylamine N-acetyltransferase (EC 2.3.1.87) // Sci. Rep. 2018. V. 8. № 1. P. 2435.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-20802-6>
 13. Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. № 17. P. 3389–3402.
<https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
 14. Sievers F., Wilm A., Dineen D. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega // Mol. Syst. Biol. 2011. V. 7. P. 539.
<https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
 15. Elsaghir H., Reddivari A.K.R. Bacteroides Fragilis // 2021 Jun 4. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publ., 2022 Jan. PMID: 31971708.
 16. Lück R., Deppenmeier U. Genetic tools for the redirection of the central carbon flow towards the production of lactate in the human gut bacterium *Phocaeicola (Bacteroides) vulgates* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2022. V. 106. № 3. P. 1211–1225.
<https://doi.org/10.1007/s00253-022-11777-6>
 17. Shirvani-Rad S., Ejtahed H.S., Ettehad Marvasti F. et al. The role of gut microbiota-brain axis in pathophysiology of ADHD: A systematic review // Atten. Disord. 2022. V. 20. P. 10870547211073474. Online ahead of print.
<https://doi.org/10.1177/10870547211073474>
 18. Colautti A., Arnoldi M., Comi G. et al. Antibiotic resistance and virulence factors in lactobacilli: something to carefully consider // Food Microbiol. 2022. May. 103:103934.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103934>
 19. Fatahi-Bafghi M., Naseri S., Alizehi A. Genome analysis of probiotic bacteria for antibiotic resistance genes // Antonie Van Leeuwenhoek. 2022. Jan 6. Epub ahead of print.
<https://doi.org/10.1007/s10482-021-01703-7>

Human Intestinal Microbiome – A Reservoir of Aminoglycoside-N-Acetyl Transferases – Drug Resistance Genes

M. G. Alekseeva^a, *, N. V. Zakharevich^a, A. V. Ratkin^a, and V. N. Danilenko^a

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

*e-mail: Alekseevamg@mail.ru

The human gut microbiome is a complex ecosystem that plays a key role in maintaining overall homeostasis and is a dynamic reservoir of antibiotic resistance genes that can be transferred between bacteria in mixed populations. One of the main enzymes that carry out the acetylation of a wide range of substrates are aminoglycoside-N-acetyltransferase (AAC). Previously, the bifunctional enzyme AAC(6')-Ie/APH(2'')-Ia was identified and characterized in *Enterococcus* and *Staphylococcus*, which is a clinically important enzyme. Within the framework of this study, genes encoding AAC(3) were identified in the sequenced genomes of strains belonging to *Bacteroides* and *Lactobacillus*. In the genomes of strains belonging to most species of *Bacteroides*, *Enterococcus*, and *Lactobacillus*, genes encoding Eis have been identified. The sequences of all identified AAC(3) and Eis do not resemble the sequences of known enzymes. AAC(3) and Eis in these bacteria may have different functions in the human body, including participation in the acetylation of peptides, proteins, and other substrates.

Keywords: human gut microbiome, *Bacteroides*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, aminoglycoside-N-acetyltransferase (AAC), Enhanced intracellular survival (Eis) protein.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ГЕНОМНЫЙ, ТРАНСКРИПТОМНЫЙ И ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ ШТАММА *Limosilactobacillus fermentum* U-21, ПЕРСПЕКТИВНОГО ДЛЯ СОЗДАНИЯ ФАРМАБИОТИКА¹

© 2022 г. Е. У. Полуэктова¹ *, Д. А. Мавлетова¹, М. В. Одорская¹, М. В. Марсова¹,
К. М. Климина^{1,2}, Т. А. Кошенко¹, Р. А. Юнес¹ **, В. Н. Даниленко¹

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

²Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины
Федерального медико-биологического агентства России, Москва, 119435 Россия

*e-mail: epolu@vigg.ru

**e-mail: romanyunes@gmail.com

Поступила в редакцию 22.03.2022 г.

После доработки 07.04.2022 г.

Принята к публикации 12.04.2022 г.

В настоящее время в мире происходят революционные изменения в области разработки и использования фармакологических препаратов на основе бактерий и их биологически активных компонентов. Наиболее перспективным становится разработка фармабиотиков — живых биотерапевтических препаратов и/или их метаболитов и компонентов с установленными фармакологическими ингредиентами, механизмом действия и направленных на лечение конкретных нозологий. При создании фармабиотиков кроме традиционных микробиологических и биотехнологических подходов используется комплекс омиксных технологий, геномных, транскриптомных и протеомных. В представленной работе данные технологии были использованы для характеристики отобранного ранее по ряду уникальных антиоксидантных свойств штамма *Limosilactobacillus fermentum* U-21. Геномный анализ штамма позволил выявить 29 генов, продукты которых могут проявлять антиоксидантные свойства, в том числе в отношении организма исследуемых животных. Наиболее важными могут быть гены тиоредоксинового комплекса и метаболизма и транспорта тяжелых металлов. В качестве индуктора оксидативного стресса использована перекись водорода. 380 генов демонстрировали увеличение экспрессии и 370 генов демонстрировали снижение экспрессии более чем в 2 раза. Наибольшее увеличение экспрессии (в 14–24 раза) показали гены предпологаемого оперона карбоксилазы мочевины. Важными для последующих исследований являются изменения экспрессии генов транспорта, в том числе ионов металлов Fe²⁺ и Cu²⁺, а также синтеза и катаболизма некоторых аминокислот. Протеомный анализ экзопротеома штамма позволил идентифицировать белок шаперонного комплекса ClpB, который может играть ключевую роль в рефолдинге неправильно собранных в результате оксидативного стресса белков в различных тканях и органах организма животных. Использование комплекса омиксных технологий для характеристики терапевтических свойств и механизма действия штамма *L. fermentum* U-21 является одним из первых примеров в этом направлении.

Ключевые слова: фармабиотики, антиоксиданты, омиксные технологии, лактобациллы.

DOI: 10.31857/S0016675822090120

В последние годы в мире происходят революционные изменения в области разработки и использования фармакологических препаратов на основе бактерий — обитателей микробиоты человека и животных — и их биологически активных ингредиентов. Такие препараты все чаще называются фармабиотиками в противовес пробиотикам, используемым в основном как биологические ак-

тивные добавки и употребляемым здоровыми людьми. Фармабиотики — это живые биотерапевтические препараты и/или их метаболиты и компоненты с установленными фармакологическими ингредиентами, механизмом действия и направленные на лечение конкретных нозологий [1–5]. В связи с этим сформировался консенсус о необходимости изучения конкретных свойств штаммов и генов, определяющих проявление нужного эффекта [6–13]. Для создания фармабиотиков кроме традиционных микробиологических и

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0016675822090120 для авторизованных пользователей.

биотехнологических подходов используется комплекс омиксных технологий, геномных, транскриптомных и протеомных.

Лактобациллы являются важнейшим компонентом микробиоты человека и благодаря активному синтезу биологически активных соединений и двунаправленной связи с организмом хозяина могут влиять на состояние и антиоксидантный (АО) статус организма [14–16]. АО активность отдельных штаммов лактобацилл подтверждается многими исследованиями, использующими различные модели *in vitro* и *in vivo* [11, 17, 18].

Исследуемый штамм *Limosilactobacillus fermentum* U-21 проявил высокую АО активность в исследованиях на моделях *in vitro* и *in vivo* с использованием индуктора окислительного стресса (ОС) параквата. Выявленная АО активность была подтверждена стандартными химическими методами. В частности, в биолюминесцентной системе *E. coli* K-12 было установлено, что культуральная жидкость штамма *L. fermentum* U-21 подавляет активность оксиданта параквата на 25% [17]. На модели свободноживущей нематоды *Caenorhabditis elegans* штамм *L. fermentum* U-21 увеличивал медианную продолжительность жизни нематоды в условиях ОС [18]. На модели индуцированного паркинсонизма у грызунов введение *L. fermentum* U-21 параллельно с инъекциями параквата предотвращало деградацию допаминергических нейронов мозга [18] и патологические изменения внутренних органов [19]. В совокупности полученные данные демонстрируют уникальные АО свойства штамма, позволяющие позиционировать его в качестве перспективного кандидата для разработки препаратов для лечения и профилактики различных воспалительных заболеваний, включая кардиологические, аутоиммунные и паркинсонизм [5, 11, 12, 19].

Цель данной работы – использовать комбинацию геномных, транскриптомных и протеомных технологий для выявления генов и белков, потенциально определяющих уникальные АО свойства штамма *L. fermentum* U-21.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальный штамм и условия роста

Бактериальные штаммы выделены из организма людей – жителей центрально-европейской части РФ. Штаммы *L. fermentum* U-21, *L. fermentum* 279 были выделены из фекалий, штамм *L. fermentum* 103 выделен из слепой кишки. Штамм *L. fermentum* U-21 депонирован в международной коллекции ВКПМ (Москва) под номером В-12075. Штаммы выращивали на среде MRS (HiMedia) при 37°C в частично анаэробных условиях (в эксикаторе, где кислород был выжжен горением свечи). Для транскриптомного анализа бактериальную культуру

выращивали до экспоненциальной фазы роста ($OD_{600} = 0.6$). Культуру центрифугировали, ресуспендировали в среде MRS (контроль) и в среде MRS с 10 mM H_2O_2 (опыт), инкубировали 30 мин при 37°C, центрифугировали и ресуспендировали в том же объеме свежей среды. Отбирали по 1 мл суспензии в трех повторностях для контроля и в трех – для опыта. Жизнеспособность бактериальной культуры при такой обработке H_2O_2 не изменялась. Для протеомного анализа бактериальные культуры выращивали до стационарной фазы роста ($OD_{600} = 2.5$).

Секвенирование, сборка и аннотация геномов штаммов лактобацилл

Геномная ДНК штаммов *L. fermentum* была получена с помощью набора GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Merck) в соответствии с инструкцией производителя. Секвенирование геномов проводилось в компании “Евроген” на приборе Illumina MiSeq набор v2 с двух сторон, длина прочтений 2*250 нуклеотидов, покрытие более 100.

Сборка геномов *de novo* осуществлялась с помощью программы SPAdes-3.11.0, адаптеры были отрезаны с помощью программы Trimmomatic-0.36. Нуклеотидные последовательности ДНК штаммов были депонированы в базе данных GenBank NCBI (WGS PNBB01, PGGI01, PGGE01). Аннотация геномов осуществлялась программой NCBI Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline (PGAAP) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/Pipeline.html>).

Геномный анализ

Биоинформатический поиск генов, проявляющих АО свойства, в геноме *L. fermentum* U-21 проводили с помощью созданного нами на основе литературных источников референсного каталога генов белков-антиоксидантов, встречающихся в различных видах и штаммах лактобацилл [11; <https://github.com/Alexey-Kovtun/Catalog>], и алгоритма их поиска [20]. Использовали также сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей исследуемого штамма со штаммами сравнения и анализ ближайшего окружения найденных генов при помощи Sequence Set Browser. Гипотетическим опероном считали совокупность генов, располагающихся на одной цепи ДНК не далее чем в 30 пн друг от друга и изменявших экспрессию в условиях окислительного стресса в одном направлении.

Выделение РНК L. fermentum U-21

Культуру промывали RNeasy Protect Bacteria Reagent (Qiagen). Разрушение клеток проводили в пробирках Lysing Matrix B на приборе MagNA

Lyzer (Roche) в течение 30 с. Далее РНК выделяли на автоматической станции King Fisher (Thermo Fisher Scientific) набором MagMAX™ mirVana™ Total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific). Выделенную РНК обрабатывали набором TURBO DNA-free kit (Thermo Fisher Scientific). Дополнительную очистку РНК проводили Agencourt RNA Clean XP kit (Beckman Coulter). Количество и качество выделенной тотальной РНК оценивали на приборе Qubit набором Quant-it RiboGreen RNA assay (Thermo Fisher Scientific) и на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) набором RNA 6000 Pico chip (Agilent Technologies).

Приготовление транскриптомных библиотек и секвенирование РНК

Тотальную РНК (500 нг) использовали для приготовления библиотек. Рибосомальная РНК удалялась с помощью набора Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit (Illumina). Библиотеки были подготовлены при помощи набора NEBNext® Ultra II Directional RNA Library Prep Kit (NEB). Очистку РНК проводили при помощи магнитных частиц RNA Clean XP, а окончательная чистка библиотек проводилась Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter). Размер и качество библиотек оценивали при помощи высокочувствительного ДНК-чипа (Agilent Technologies). Концентрацию библиотек измеряли набором Quant-iT DNA Assay Kit, High Sensitivity (Thermo Fisher Scientific). Библиотеки смешивали эквимольно и разводили до конечной концентрации 12 пМ. Секвенирование готовых библиотек проводили на Illumina HiSeq 2500 с добавлением в качестве контроля 1% Phix (Illumina).

Обработка и анализ транскриптомных данных

Контроль качества необработанных чтений проводили с помощью FASTQC v0.11.5. Адаптеры обрезали с помощью программы Trimmomatic v0.33. Программное обеспечение Kallisto v0.46.0 использовалось для картирования чтений и оценки обилия транскриптов. Дифференциальный анализ экспрессии проводили с помощью пакета edgeR v3.26.8, интегрированного в веб-инструмент Degust v4.1.1. Далее анализировались только гены с количеством на миллион (CPM) ≥ 1 . Гены были отфильтрованы на основе отсечения частоты ложных обнаружений (FDR) ≤ 0.05 и минимального изменения складки экспрессии (FC) ≥ 1 . Выделение РНК и RNAseq были сделаны в Федеральном научно-клиническом центре физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства России.

Выделение белков культуральной жидкости

Бактериальные клетки отделяли от культуральной жидкости центрифугированием, затем культуральную жидкость фильтровали через PES мембрану (0.22 мкм), добавляли PMSF до конечной концентрации 1 мМ. Белки осаждали смесью 80% ацетон, 10% ТХУ, 20 мМ ДТТ в соотношении образец : осадитель – 1 : 5 в течение 20 ч при температуре -20°C . Осадок отделяли центрифугированием и трижды промывали 90%-ным ацетоном. Для удаления остатков растворителя осадок подсушивали при комнатной температуре. Полученный осадок растворяли в буфере для нанесения SDS-ПААГ, центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин. Концентрацию белков, содержащихся в полученном супернатанте, определяли на флуориметре Qubit 2.0. Белки разделяли в 12.5%-ном SDS-ПААГ, с последующим окрашиванием СВВ-Г 250.

Масс-спектрометрический анализ

Для масс-спектрометрического анализа окрашенные белковые полосы вырезали из ПААГ. Пептиды были разделены с помощью системы Ultimate 3000 Nano LC (Thermo Fischer Scientific), связанной с Q Exactive HF – масс-спектрометром (Thermo Fischer Scientific) через источник наноэлектроспрея (Thermo Fischer Scientific) на базе группы масс-спектрометрии ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Анализ данных LC-MS/MS проводился с использованием программного обеспечения PEAKS Studio 8.0 build 2016-0908. Первичные структуры пептидов, генерируемых программным обеспечением PEAKS Studio, были проанализированы на основе базы данных белковых последовательностей UNIPROT KB (07.2016). Допустимая частота ложных обнаружений была установлена на уровне 0.01 и определена путем корреляции набора данных MS/MS с обратной базой данных последовательности белка, сгенерированной студией PEAKS. Идентификацию пептидов проводили при допустимом отклонении массы исходного иона-предшественника до 10 ppm и допустимом отклонении массы фрагмента 0.05 Da.

РЕЗУЛЬТАТЫ

*Идентификация и характеристика генов *L. fermentum* U-21, потенциально определяющих антиоксидантные свойства*

В геноме штамма *L. fermentum* U-21 были выявлены 29 генов, определяющих белки с АО свойствами. Они перечислены в табл. S1 в Приложении. Важную роль в АО защите бактерий играют белки, содержащие тиольные группы, прежде всего глутатион и тиоредоксин. Штамм *L. fermentum* U-21 име-

ет гены, определяющие только первый из двух этапов синтеза глутатиона и, вероятно, не способен его продуцировать. В геноме отсутствуют и гены глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, глутатион-S-трансферазы, однако штамм способен импортировать глутатион из среды роста. Транспорт глутатиона через цитоплазматическую мембрану осуществляют белки CudD/CudC. Соответствующие гены входят в состав оперона, включающего также гены субъединиц I и II цитохром-убихинол оксидазы, осуществляющей векторный перенос протонов через мембрану и являющейся компонентом аэробной дыхательной цепи.

Наиболее важную роль в защите от окислительного стресса играют белки тиоредоксиновой системы. Тиоредоксин может восстанавливать дисульфидные связи других белков и участвует в обезвреживании активных форм кислорода, передавая электроны различным пероксидазам. Восстановление тиоредоксина осуществляет тиоредоксинредуктаза [21]. В геноме штамма были идентифицированы четыре гена тиоредоксина (из них три определяют белки с каноническим для тиоредоксина активным сайтом WCGDC), расположенных в разных контигах; тиоредоксинредуктаза, а также глутаредоксин, имеющий сходную с тиоредоксином активность. Штамм имеет два гена тиолпероксидаз, а также еще одну тиолпероксидазу – пероксиредоксин (субъединицу С щелочной гидропероксидредуктазы); его восстановление осуществляет субъединица F щелочной гидропероксидредуктазы. Штамм содержит также гены пероксиредоксина семейства OsmC, обладающего пероксидазной активностью по отношению к органическим гидропероксидам.

Другой важный механизм АО защиты у лактобацилл – хелатирование ионов металлов, Fe^{2+} и Cu^{2+} . Ионы металлов способны инициировать образование реактивных форм кислорода и запускать перекисное окисление липидов. В геноме штамма идентифицированы два гена, кодирующих белки транспорта двухвалентного железа; выведение ионов железа из клетки снижает вероятность реакции Фентона и образования реактивных форм кислорода. Dps-белок катализирует окисление ионов Fe^{2+} перекисью водорода. В геноме также идентифицирован ряд генов транспорта меди. Соответствующие опероны изображены на рис. 1, а–в. Это гены белков-переносчиков тяжелых металлов – АТФаз Р-типа, медь-транслоцирующих АТФаз Р-типа, белков, содержащих купредоксиновый домен, репрессоров транспорта меди. Идентифицирован также отдельный ген медь-транслоцирующей АТФазы Р-типа (табл. S1 Приложения). Известные модели описывают ферменты-переносчики тяжелых металлов АТФазы Р-типа – как ответственные за перенос ионов меди и кадмия (и

других двухвалентных тяжелых металлов, таких как кобальт, ртуть, свинец и цинк) через биологические мембраны. Эти переносчики содержатся в прокариотах и растениях и экспериментально охарактеризованы. Кластеры данных генов характерны для лактобацилл и встречаются у многих представителей семейства. Белки с купредоксиновым доменом относятся к семейству маленьких белков, способных связывать один атом меди и активно влиять на проявление АО свойств. Купредоксина играют ключевую роль в биологическом переносе электронов и способны реагировать с широким спектром окислительно-восстановительных партнеров. Например, купредоксина зурина *Pseudomonas aeruginosa* замедляет одноэлектронный перенос между ферментами, связанными с цепью цитохрома, является многоцелевым противоопухолевым агентом, влияющим на сигнальный путь p53 и сигнальный путь нерцепторных тирозинкиназ [22].

Сравнение штамма *L. fermentum* U-21 со штаммами *L. fermentum* 279 и *L. fermentum* 103, не проявляющими антиоксидантных свойств, выявило 138 уникальных генов. Среди них семь генов были связаны с АО активностью и метаболизмом ионов тяжелых металлов (табл. 1). Особенно стоит отметить оперон, расположенный в контиге PNBB01000070.1 и состоящий из генов, кодирующих MFS-транспортер, феррохелатазу и гем-зависимую пероксидазу (рис. 1, г). MFS-транспортеры – мембранные транспортные белки, осуществляющие перемещение небольших растворенных соединений через клеточные мембраны; феррохелатаза – конечный фермент синтеза гема, катализирующий включение двухвалентного железа. Данный кластер является крайне редким у *L. fermentum* и обнаруживается только в семи геномах штаммов этого вида, депонированных в GenBank.

Анализ уникальных и редких генов у *L. fermentum* U-21 по сравнению со 107 штаммами *L. fermentum*, депонированными в базе данных NCBI на 28.02.2022, выявил 15 генов (табл. S2 Приложения). Наибольшее число подобных генов локализуется в контигах PNBB01000040.1 и PNBB01000051.1 (по 6 генов). Первая группа содержит гены транскрипционного регулятора, белка, определяющего резистентность к кадмию, токсина YafQ семейства токсин–антитоксинов II типа, резольвазы и ряда гипотетических белков. Вторая группа генов является исключительно уникальной для штамма *L. fermentum* U-21. Среди белков, кодируемых генами этой группы, есть три гликозилтрансферазы, серинацетилтрансфераза, белок метаболизма фосфорилхолина.

Полученные данные являются первым этапом в идентификации генов, определяющих свойства штамма *L. fermentum* U-21. Последующие исследова-

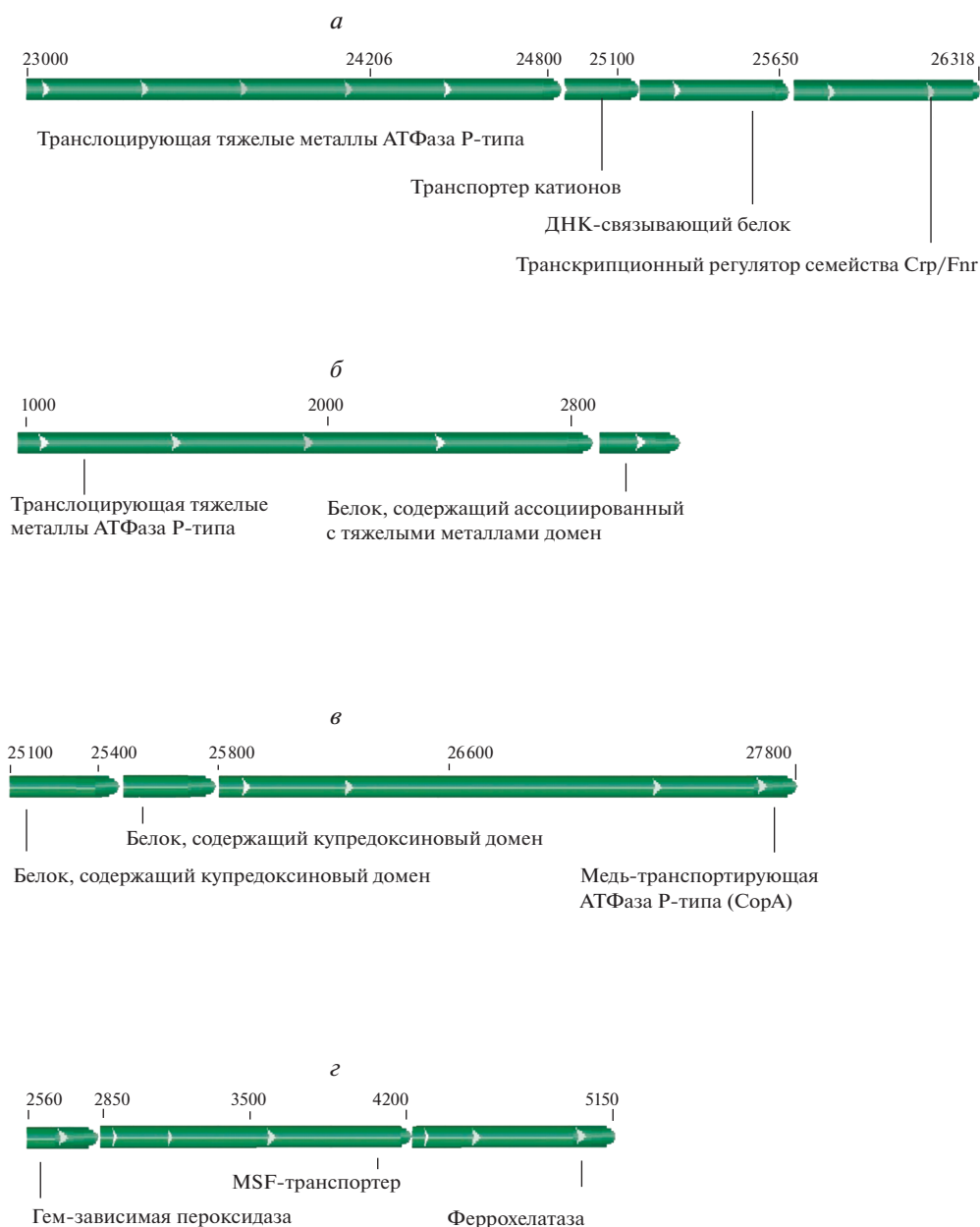


Рис. 1. Предполагаемые (гипотетические) опероны, содержащие гены белков связывания и транспорта тяжелых металлов в геноме штамма *L. fermentum* U-21. *а* – схема оперона из контига PNBB01000020.1, содержащего гены белков транслоцирующей тяжелые металлы АТФазы Р-типа (C0965_05525), транспортера катионов (C0965_05530), ДНК-связывающего белка (C0965_05535), транскрипционного регулятора Стр/Fnr (C0965_05540); *б* – схема оперона из контига PNBB01000024.1, содержащего гены белков с купредоксиновым доменом (C0965_06085, C0965_06090) и медь-транспортирующую АТФазу Р-типа (C0965_06095); *в* – схема оперона из контига PNBB01000074.1, содержащего гены белков транслоцирующей тяжелые металлы АТФазы Р-типа (C0965_09625) и белка, содержащего ассоциированный с тяжелыми металлами домен (C0965_09630); *г* – схема оперона, уникального для штамма *L. fermentum* U-21, включающего гены гем-зависимой пероксидазы (C0965_09505), MFS-транспортера (C0965_09510) и феррохелатазы (C0965_09515).

дования транскриптома и протеома, проводимые в лаборатории генетики микроорганизмов ИОГен РАН, позволят получить больше информации о генах и их продуктах, определяющих свойства штамма *L. fermentum* U-21.

Транскриптомный анализ

Нас интересовало, какие гены/белки штамма *L. fermentum* U-21, кроме перечисленных в предыдущем разделе, определяют ответ штамма на окислительный стресс. В качестве индуктора

Таблица 1. Белки, связанные с метаболизмом тяжелых металлов и обнаруженные в геноме штамма *L. fermentum* U-21 и отсутствующие в геномах штаммов *L. fermentum* 103 и *L. fermentum* 279

Контиг	Идентификатор гена	Идентификатор белка	Название фермента	Предполагаемая функция фермента
PNBV01000011.1	C0965_03855	WP_048339862.1	Оксидаза, содержащая три купредоксиновых домена	Связывание и транспорт ионов меди/железа
PNBV01000040.1	C0965_07955	WP_056959392.1	Оксидаза, содержащая три купредоксиновых домена	Связывание и транспорт ионов меди/железа
PNBV01000040.1	C0965_08000	WP_102116156.1	Белок, определяющий устойчивость к кадмию	Экспорт или связывание ионов кадмия
PNBV01000060.1	C0965_09170	WP_035437569.1	Репрессор переноса меди семейства CopY/TcrY	Взаимодействие с ДНК, регуляция экспрессии генов
PNBV01000070.1	C0965_09505 (фрагмент гена)	WP_003680658.1	Гем-зависимая пероксидаза	Расщепление перекиси
PNBV01000070.1	C0965_09510	WP_035435948.1	MFS-транспортер	Мембранный транспортер
PNBV01000070.1	C0965_09515	WP_021349248.1	Феррохелатаза	Конечный фермент синтеза гема

стресса была выбрана перекись водорода. С ней бактериальные клетки сталкиваются в процессе своей жизнедеятельности, так как она наряду с другими реактивными формами кислорода продуцируется клетками иммунной системы макроорганизма при инфекции и воспалении [23]. Использовали концентрацию перекиси, не влияющую на жизнеспособность клеток штамма в данный отрезок времени (10 мМ, 30 мин).

Таблица 2. Численность генов, изменивших экспрессию под действием перекиси водорода в 2 и более раз

Изменение экспрессии генов в N раз	Число генов с увеличенной экспрессией +	Число генов с уменьшенной экспрессией –
70	–	1
37	–	1
32	–	1
30	–	1
28	–	1
24	1	–
23	–	2
22	1	–
19–11	12	12
10–8	16	13
7–4	91	59
3	81	79
2	178	200
Всего	380	370

Экспрессия генов после действия перекиси резко изменилась, 380 генов демонстрировали увеличение экспрессии в 2 и более раз, 370 демонстрировали уменьшение в 2 и более раз (табл. 2), эти гены составляли 42.56% всех исследованных генов. Численность генов с увеличенной и уменьшенной экспрессией была приблизительно одинакова, однако максимальные значения дифференциальной экспрессии генов (ДЭГ) были больше для уменьшенной экспрессии (70–28 раз), чем для увеличенной экспрессии (24–22 раза).

Далее ДЭГ были проанализированы по функциональной активности соответствующих им белков (COG). На рис. 2 представлено распределение по COG-категориям белков, соответствующих генам с измененной в более 2 раза экспрессией. Из 26 стандартных COG-категорий (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/research/cog/>) рассматриваемые белки распределились в 20 категорий. Белки, соответствующие генам с увеличенной и уменьшенной экспрессией, входили примерно в одинаковом соотношении в категории E (транспорт и метаболизм аминокислот), K (транскрипция) и C (выработка и преобразование энергии). Для большей части категорий были различия для генов с увеличенной и уменьшенной экспрессией. Белки, соответствующие генам только или преимущественно с увеличенной экспрессией, были представлены в категориях V (защитные механизмы), X (мобилом), P (транспорт и метаболизм неорганических ионов), L (репликация, рекомбинация, репарация), O (посттрансляционная модификация, шапероны), N (подвижность клеток). Категории F (транспорт и метаболизм нуклеотидов), Q (синтез, транспорт и метаболизм вторичных метаболитов),

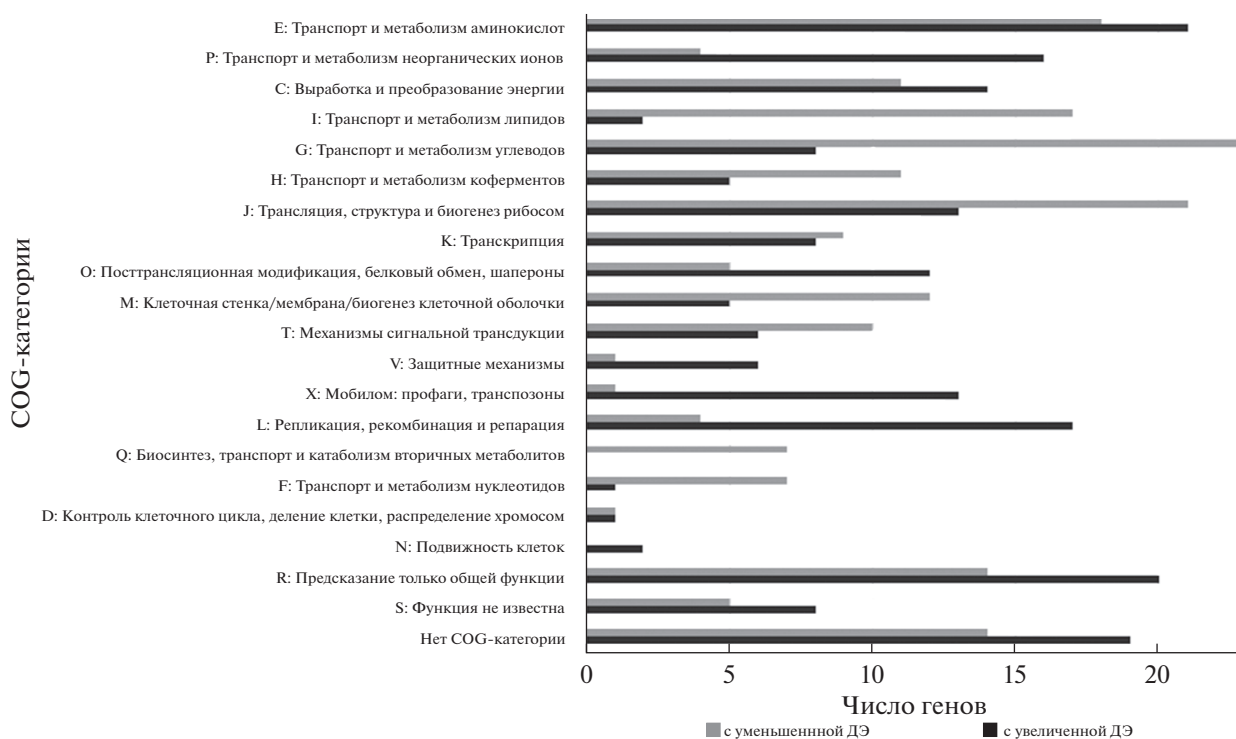


Рис. 2. Распределение белков, соответствующих генам со значительно измененной экспрессией (больше чем в 2 и меньше чем в 2 раза по сравнению с контролем), по функциональным категориям Clusters of Orthologous Groups (COG).

І (транспорт и метаболизм липидов), G (транспорт и метаболизм углеводов), Н (транспорт и метаболизм коферментов), Т (механизмы сигнальной трансдукции), М (биогенез клеточной стенки и мембран) включали белки, соответствующие генам только или преимущественно с уменьшенной экспрессией.

Однако функциональная характеристика белков, соответствующих генам с ДЭ, не дает полного представления о процессах, происходящих в бактериальной клетке при окислительном стрессе. Так, гены, C0965_01070 и C0965_08155, аннотированные как кодирующие биотин-карбоксильный белок-носитель ацетил-КоА-карбоксилазы, изменяли экспрессию в -7 и $+16$ раз соответственно. По-разному реагировали на стресс увеличением или уменьшением экспрессии гены пероксиредоксина OsmC-семейства (C0965_08900 и C0965_05480) и репрессора транспорта меди CopY/TcrY (C0965_09170 и C0965_08735). Вероятно, более точное представление можно получить при анализе не отдельных генов, а оперонов. Характеристика оперонов и отдельных генов, не входящих в опероны, демонстрирующих наибольшее отклонение экспрессии от контроля, приведены в табл. S3 Приложения.

Наибольшее увеличение экспрессии (в 24–14 раз) демонстрировали гены C0965_08140–

C0965_08165, предположительно составляющие один оперон карбоксилазы мочевины (UCA). Комплекс 5.5 тпн шести генов *L. fermentum* U-21 является видоспецифичным для *L. fermentum*, он кодирует UCA-аллофанатгидролазный путь деградации мочевины. Уреазная активность штамма *Limosilactobacillus reuteri* 100–23 в желудке мышей повышала кислотоустойчивость штамма [24]. UCA может использоваться бактериями для ассимиляции источников азота [25]. Значительно увеличивалась экспрессия оксидоредуктаз, ферментов биосинтеза пролина, катаболизма дисахаридов, белков транспорта витаминов.

Перекись водорода повреждает различные клеточные структуры – ДНК, белки, клеточные мембраны. Экспрессия генов репарационных белков – метионинсульфоксидредуктаз, *mrsA* и *mrsB*, C0965_06645 и C0965_01540 также возрастала в 7–8 раз. Эти ферменты обеспечивают дисульфидный путь восстановления поврежденных в результате окисления остатков метионинсульфоксида в белках до метионина [26]. Увеличивается экспрессия генов полифосфаткиназы (C0965_06785), осуществляющей фосфорилирование нуклеозидов и обеспечивающей устойчивость к стрессу [27]. Увеличена экспрессия гена рекомбиназы *hesA*.

Максимальное уменьшение экспрессии (в 18–70 раз) демонстрировали опероны и отдельные

Таблица 3. Белки, идентифицированные в экзопротеоме штамма *L. fermentum* U-21

№	Идентификатор гена	Идентификатор белка	Название белка
1	C0965_08340	PLY17634.1	Белок семейства фосфокетолаз
2	C0965_04780	PLY18262.1	ClpВ, АТФ-связывающая субъединица Clp протеазы
3	C0965_01125	PLY18973.1	Шаперонин GroEL
4	C0965_07280	PLY17803.1	Альфа-субъединица цитратлиазы
5	C0965_07940	PLY17705.1	НАДФ-зависимая фосфоглюконатдегидрогеназа
6	C0965_10225	PLY17327.1	Глюкозо-6-фосфатизомераза
7	C0965_04525	PLY18352.1	Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа
8	C0965_07285	PLY17804.1	Бета-субъединица (pro-3S)-цитратлиазы
9	C0965_04410	PLY18330.1	LysM белок, содержащий пептидогликан-связывающий домен

гены синтеза компонентов АВС-транспортёров, аргинина и орнитина, фосфотрансферазных систем транспорта сахаров, синтеза жирных кислот.

Подавляющее большинство генов, определяющих белки с АО, изменяли экспрессию при действии перекиси водорода, увеличивая ее в 2–4 раза. Увеличение экспрессии отмечено для генов, кодирующих субъединицы алкилгидропероксидоредуктазы – F и C (пероксиредоксин), тиоредоксин (4 гена), медь-транслоцирующие АТФазы (2 гена), пероксидазу, глутаредоксин, феррохелатазу. Наибольшее увеличение экспрессии генов этой группы отмечено для оперона, содержащего гены, кодирующие тиоредоксиноредуктазу и цистеинсинтазу (табл. S3 Приложения) (в 8–10 раз), и оперона, содержащего гены переносчика тяжелых металлов АТФазы Р-типа и белка, содержащего ассоциированный с тяжелыми металлами домен (рис. 1, в) (в 3.9–5.6 раз). Уменьшение экспрессии отмечено только для нескольких генов этой группы (менее чем в 2 раза). Более значительное уменьшение экспрессии (в 3–4 раза) отмечено только для генов, кодирующих глутаматцистеинлигазу, катализирующую первый этап синтеза глутатиона (табл. S1 Приложения).

Увеличивалась также экспрессия генов, определяющих стрессовые белки, – небольшого белка теплового шока Lo18, свойственного лактобациллам; АТФ-зависимой протеолитической субъединицы ClpP протеазы Clp; шаперонов GroEL и DnaJ; мембранных белков щелочного стресса. Увеличивалась экспрессия генов системы токсин–антитоксин YafQ/RelB и резольваз IS-элементов.

Протеомный анализ

Задачей данной части работы было выявление потенциальных белков, определяющих пробиотические и антиоксидантные свойства штамма *L. fermentum* U-21. Наиболее важные для взаимо-

действия с макроорганизмом белки бактерий находятся в культуральной жидкости. Методом масс-спектрометрии были идентифицированы основные белки, присутствующие в супернатанте стационарной культуры штамма *L. fermentum* U-21. Полученные результаты представлены в табл. 3 и на рис. 3, а. Выявленные белки относятся к различным функциональным группам. Наиболее многочисленной среди идентифицированных белков является группа гомологов ферментов, участвующих в метаболизме углеводов, – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, фосфокетолаза, фосфоглюконатдегидрогеназа, глюкоза-6-фосфатизомераза. Были идентифицированы два белка, обладающих шаперонной активностью, – шаперонин GroEL и ClpВ, а также два фермента, участвующих в метаболизме ацетил-КоА – альфа-субъединица цитратлиазы и бета-субъединица цитратлиазы (pro-3S). Следует отметить, что гомологи идентифицированных белков были обнаружены при изучении экзопротеомов других видов лактобацилл [28, 29]. Кроме того, большинство этих белков относят к мунлайт-белкам, т.е. многофункциональным белкам, в которых одна полипептидная цепь выполняет две или более физиологически значимые биохимические или биофизические функции, в частности цитоплазматические белки выполняют вторую функцию на клеточной поверхности, часто в качестве адгезинов [30].

Далее был проведен сравнительный анализ белков культуральной жидкости штамма *L. fermentum* U-21 и двух других штаммов того же вида, не проявляющих антиоксидантных свойств, – *L. fermentum* 103 и *L. fermentum* 279. Состав белковых компонентов данной фракции у штаммов обнаружил качественные и количественные различия (рис. 3, б). Наиболее существенные различия в белках экзопротеома штаммов были связаны с двумя белками – белком, содержащим LysM-домен связывания с пептидогликаном, и ClpВ-белком. LysM-белок есть и у двух других исследуемых штаммов *L. fermentum*, однако у штаммов *L. fer-*

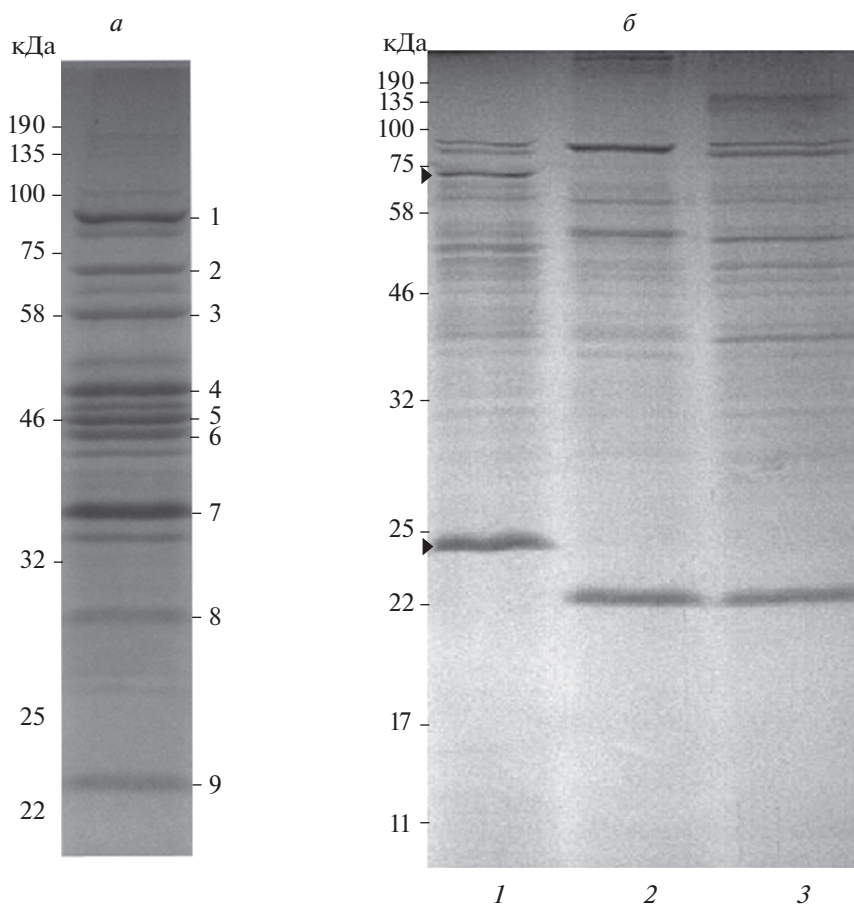


Рис. 3. Электрофореграмма белков культуральной жидкости штаммов *L. fermentum*. *a* – белки штамма *L. fermentum* U-21. Указаны молекулярные массы стандартных маркерных белков. Цифрами справа (1–9) отмечены идентифицированные методом масс-спектрометрии белки, перечисленные в табл. 3; *б* – белки различных штаммов *L. fermentum*: 1 – *L. fermentum* U-21, 2 – *L. fermentum* 103, 3 – *L. fermentum* 279. Стрелками слева отмечены белки ClpB и LysM.

mentum 103 и *L. fermentum* 279 он имеет меньшую молекулярную массу. Различия связаны со вставкой короткого полипептида из восьми аминокислот у штамма *L. fermentum* U-21. Гены, соответствующие белку ClpB, также есть в геномах всех трех исследуемых штаммов *L. fermentum*. Однако в культуральной жидкости этот белок обнаруживается только у штамма *L. fermentum* U-21.

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ генома *L. fermentum* U-21 выявил 29 генов, являющихся классическими примерами антиоксидантных генов бактерий. Многие из генов были объединены в опероны. Вероятно, основной защитой от окислительного стресса является тиоредоксиновая система, функционирующая посредством регуляции дитиол/дисульфидного баланса. Способность штамма *L. fermentum* U-21 нейтрализовать супероксид анион в биOLUMИнесцентной тест-системе *E. coli* по-видимому определяется, во всяком случае отчасти, тиоредоксиновой систе-

мой. Хотя эта система широко распространена у лактобацилл, ее эффект может варьировать за счет полиморфизма генов, кодирующих белки, входящие в ее состав, и за счет изменения регуляции активности генов. Экспрессия большинства генов, составляющих тиоредоксиновую систему у *L. fermentum* U-21, была увеличена в результате экспозиции к перекиси водорода (см. табл. S1). Также были выявлены четыре группы генов, связанные с метаболизмом тяжелых металлов и потенциально образующие опероны (см. табл. S1, S2). Наличие значительного количества генов транспорта ионов меди, а также транспорта двухвалентного железа, гена *dps* ДНК-защитающего белка и феррохелатазы свидетельствует о том, что значительный вклад в антиоксидантные свойства штамма вносит процесс хелатирования металлов. Стоит отметить, что составляющие оперон гены гем-зависимой пероксидазы, MFS-транспортера и феррохелатазы отсутствуют в геноме двух штаммов сравнения *L. fermentum* 103 и *L. fermentum* 279, не проявлявших сопоставимый уровень антиок-

сидантной активности. Экспрессия всех трех генов увеличилась в 2 раза в реакции на перекись водорода, что указывает на вероятность связи между активностью этих генов и проявленными антиоксидантными свойствами штамма *L. fermentum* U-21.

Получасовое действие перекиси водорода резко изменило экспрессию почти половины генов штамма *L. fermentum* U-21. Гены, вовлеченные в инактивацию перекиси и других реактивных форм кислорода, увеличивали экспрессию, но незначительно. Незначительно активировались и многие шаперонные системы. Наибольшее увеличение экспрессии отмечалось у генов, кодирующих белки, участвующие в продукции аммония как источника азота, катаболизме дисахаридов, кодирующих различные оксидоредуктазы, стрессовые белки, общие для разных видов стресса, а также ферменты, защищающие белки и нуклеиновые кислоты от окисления. Увеличивалась экспрессия генов, кодирующих элементы мобилома, — IS-элементы, системы токсин–антитоксин II типа. Резко уменьшалась экспрессия генов, кодирующих субъединицы АТФ-связывающих кассетных транспортеров (ABC-транспортеров), фосфотрансферной системы транспорта сахаров, биосинтеза жирных кислот.

Результаты окислительного стресса, вызванного перекисью водорода, зависят от многих факторов, от рода, вида и штамма бактерий, концентрации окислителя, времени его действия, присутствия кислорода в среде роста бактерий, метода исследования [31–33]. Поэтому сравнение с другими немногочисленными работами по транскриптному анализу результатов окислительного стресса, вызванного перекисью водорода у лактобацилл и близких родов бактерий [33, 34], дает самые общие заключения. Отмечается активация систем защиты белков и ДНК от окисления, изменение активности генов синтеза и транспорта аминокислот и сахаров, индукция стрессовых белков, общих для разных видов стресса. Во всех работах отмечается увеличение экспрессии генов тиоредоксинредуктазы, белков синтеза цистеина и метионинсульфоксидредуктазы — ферментов, обеспечивающих стабильность белков путем дисульфидной редукции. Протеомный анализ *Lactobacillus acidophilus* NCFM также показал увеличение в количестве белков, связанных с метаболизмом углеводов и энергии, синтезом цистеина и стрессом [35]. У *L. rhamnosus* hsrufm 1301 транскриптомный RNAseq анализ выявил перекрестную адаптацию при температурном стрессе и при действии перекиси водорода. 154 гена изменили свою активность в условиях обоих стрессов. Эти гены кодировали белки-транспортеры аминокислот и олигопептидов, белки метаболизма аминокислот и quorum sensing [36].

Результаты транскриптомного анализа штамма лактобацилл в условиях окислительного стресса позволяют значительно расширить круг ферментов бактерий, вовлеченных в ответ на стресс. Эти данные могут быть использованы для отбора пробиотических штаммов с антиоксидантной активностью, а также для разработки дополнительных компонентов в пробиотических препаратах, направленных на лечение заболеваний, связанных с окислительным стрессом, прежде всего воспалительных заболеваний.

Поиск белков, которые могут определять пробиотические и антиоксидантные свойства штамма *L. fermentum* U-21, выявил два белка, LysM и ClpB. LysM-домен обнаруживается во многих внеклеточных белках бактерий. Считается, что он обеспечивает прикрепление к полисахаридам клеточной стенки бактерий, таким как пептидогликан [37]. Пептид в составе белка LysM у *L. fermentum* U-21, отсутствующий у двух других штаммов *L. fermentum*, имеет состав Thr-Ala-Ala-Thr-Thr-Thr-Ser; если учесть еще и окружающие пептид остатки серина, то он будет выглядеть так: Ser-Thr-Ala-Ala-Thr-Thr-Thr-Ser-Ser-Ser. У штамма *Lactiplantibacillus plantarum* VMCM12 серин-треониновый пептид STp проявляет иммуномодулирующую активность на дендритных клетках кишечника, он является фрагментом секретируемого белка и образуется при действии кишечных протеаз [38]. Серин-треониновые белки других микроорганизмов способны связываться с компонентами эукариотических клеток [39]. Мы полагаем, что данный белок и входящий в его состав пептид могут осуществлять взаимодействие с клетками макроорганизма и определять пробиотические свойства штамма.

Бактериальный белок ClpB — гомолог казеинолитической пептидазы B — играет определяющую роль при выживании бактерий в условиях различных форм стресса. Белок ClpB также регулирует секрецию бактериальных эффекторных молекул VI системы секреции. Белок принадлежит к суперсемейству AAA⁺ белков (АТФазы, ассоциированные с различными клеточными активностями), является представителем семейства шаперонов Hsp100. Совместно с системой шаперонов DnaK/DnaJ/GrpE солибилизирует и реактивирует агрегированные белки. В присутствии АТФ ClpB, содержащий два нуклеотидсвязывающих домена, подвергается олигомеризации, образуя гомогексамерную кольцевую структуру, через центральную пору которой транслоцируются полипептиды, которые затем могут быть подвергнуты рефолдингу посредством шаперонной системы HSP70 [40, 41]. Наличие белка ClpB в культуральной жидкости штамма *L. fermentum* U-21 может способствовать рефолдингу поврежденных белков и определять антиоксидативные свойства штамма. У белка ClpB *E. coli* было установлено еще одно

необычное свойство — он является миметиком ключевого анорексигенного гормона меланотропина человека; это позволило понять механизм взаимодействия бактерий с системой передачи сигналов насыщения в кишечнике. Полагают, что этот бактериальный белок участвует в индукции чувства насыщения у человека [42]. Белок ClpV может играть ключевую роль в рефолдинге неправильно собранных в результате ОС белков в различных тканях и органах макроорганизма.

Использование комплекса омиксных технологий для продвижения в качестве фармабиотика штамма *L. fermentum* U-21 является одним из первых примеров в этом направлении. Полученные результаты требуют детального анализа и осмысления для выбора ключевых элементов, которые предстоит использовать при создании фармабиотиков с заданными свойствами, противовоспалительными, иммуномодулирующими и нейромодулирующими. Включение метаболомного анализа в тетраду омиксных технологий является необходимым условием.

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного задания № 0092-2022-003.

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. Sleator R.D., Hill C. Engineered pharmabiotics with improved therapeutic potential // *Human Vaccines*. 2008. V. 4. № 4. P. 271–274. <https://doi.org/10.4161/hv.4.4.6315>
2. O'Toole P.W., Marchesi J.R., Hill C. Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics // *Nature Microbiol.* 2017. V. 2. № 5. P. 17057. <https://doi.org/10.1038/Nmicrobiol.2017.57>
3. Patterson E., Cryan J.F., Fitzgerald G.F. et al. Gut microbiota, the pharmabiotics they produce and host health // *Proc. Nutr. Soc.* 2014. V. 73. № 4. P. 477–489. <https://doi.org/10.1017/S0029665114001426>
4. Cordaillat-Simmons M., Rouanet A., Pot B. Live biotherapeutic products: the importance of a defined regulatory framework // *Exp. Mol. Med.* 2020. V. 52. № 9. P. 1397–1406. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0437-6>
5. Danilenko V.N., Devyatkin A.V., Marsova M.V. et al. Common inflammatory mechanisms in COVID-19 and Parkinson's diseases: the role of microbiome and probiotics in their prevention // *J. Inflamm. Res.* 2021. V. 14. P. 6349–6381. <https://doi.org/10.2147/JIR.S333887>
6. Shanahan F., Collins S.M. Pharmabiotic manipulation of the microbiota in gastrointestinal disorders, from rationale to reality // *Gastroenterol. Clin. North. Am.* 2010. V. 39. № 3. P. 721–726. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2010.08.006>
7. Gazerani P. Probiotics for Parkinson's disease // *Intern. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 17. P. 4121. <https://doi.org/10.3390/ijms20174121>
8. De Luca F., Shoenfeld Y. The microbiome in autoimmune diseases // *Clin. Exp. Immunol.* 2019. V. 195. № 1. P. 74–85. <https://doi.org/10.1111/cei.13158>
9. Yunes R.A., Poluektova E.U., Vasileva E.V. et al. A multi-strain potential probiotic formulation of GABA-producing *Lactobacillus plantarum* 90sk and *Bifidobacterium adolescentis* 150 with antidepressant effects // *Probiotics Antimicrob. Proteins.* 2020. V. 12. № 3. P. 973–979. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09601-1>
10. Maria Remes Troche J., Coss Adame E., Angel Valdovinos Diaz M. et al. *Lactobacillus acidophilus* LB: A useful pharmabiotic for the treatment of digestive disorders // *Therap. Adv. Gastroenterol.* 2020. V. 13. P. 1756284820971201. <https://doi.org/10.1177/1756284820971201>
11. Averina O.V., Poluektova E.U., Marsova M.V., Danilenko V.N. Biomarkers and utility of the antioxidant potential of probiotic lactobacilli and bifidobacteria as representatives of the human gut microbiota // *Biomedicines*. 2021. V. 9. № 10. P. 1340. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9101340>
12. Poluektova E., Yunes R., Danilenko V. The putative antidepressant mechanisms of probiotic bacteria: relevant genes and proteins // *Nutrients*. 2021. V. 13. № 5. P. 1591. <https://doi.org/10.3390/nu13051591>
13. Tan A.H., Lim S.-Y., Chong K.K. et al. Probiotics for constipation in Parkinson disease: A randomized placebo-controlled study // *Neurology*. 2021. V. 96. № 5. P. e772–e782. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000010998>
14. Mishra V., Shah C., Mokashe N. et al. Probiotics as potential antioxidants: a systematic review // *J. Agric. Food Chem.* 2015. V. 63. № 14. P. 3615–3626. <https://doi.org/10.1021/jf506326t>
15. Nowak A., Paliwoda A., Błasiak J. Anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-oxidative activity of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains: A review of mechanisms and therapeutic perspectives // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2019. V. 59. № 21. P. 3456–3467. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1494539>
16. Wang Y., Wu Y., Wang Y. et al. Antioxidant properties of probiotic bacteria // *Nutrients*. 2017. V. 9. № 5. P. 521. <https://doi.org/10.3390/nu9050521>
17. Marsova M.V., Abilev S.K., Poluektova E.U., Danilenko V.N. A bioluminescent test system reveals valuable antioxidant properties of *Lactobacillus* strains from human microbiota // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2018. V. 34. № 2. P. 27. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2410-2>
18. Marsova M., Poluektova E., Odorskaya M. et al. Protective effects of *Lactobacillus fermentum* U-21 against paraquat-induced oxidative stress in *Caenorhabditis elegans* and mouse models // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2020. V. 36. № 7. P. 104. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02879-2>

19. Даниленко В.Н., Ставровская А.В., Воронков Д.Н. и др. Использование фармабиотика на основе штамма *Lactobacillus fermentum* U-21 с целью модуляции нейродегенеративного процесса при экспериментальном паркинсонизме // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2020. Т. 14. № 1. С. 62–69.
<https://doi.org/10.25692/ACEN.2020.1.7>
20. Ковтун А.С., Аверина О.В., Захаревич Н.В. и др. *In silico* определение метагеномной сигнатуры, отражающей нейрометаболический потенциал микробиоты кишечника человека в норме // *Генетика*. 2018. Т. 54. № 9. С. 1081–1091.
<https://doi.org/10.1134/S0016675818090084>
21. Lu J., Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system. Review // *Free Radic. Biol. Med.* 2014. V. 66. № 8. P. 75–87.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.036>
22. Gao M., Zhou J., Su Z., Huang Y. Bacterial cupredoxin azurin hijacks cellular signaling networks: Protein-protein interactions and cancer therapy. Review // *Protein Sci.* 2017. V. 26. № 12. P. 2334–2341.
<https://doi.org/10.1002/pro.3310>
23. Rivera-Chávez F., Lopez C.A., Bäuml A.J. Oxygen as a driver of gut dysbiosis. Review // *Free Radic. Biol. Med.* 2017. V. 105. P. 93–101.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.09.022>
24. Wilson C.M., Loach D., Lawley B. et al. *Lactobacillus reuteri* 100-23 modulates urea hydrolysis in the murine stomach // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. V. 80. № 19. P. 6104–6113.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01876-14>
25. Kanamori T., Kanou N., Atomi H., Imanaka T. Enzymatic characterization of a prokaryotic urea carboxylase // *J. Bacteriol.* 2004. V. 186. № 9. P. 2532–2539.
<https://doi.org/10.1128/JB.186.9.2532-2539.2004>
26. Ezraty B., Aussel L., Barras F. Methionine sulfoxide reductases in prokaryotes. Review // *Biochim. Biophys. Acta.* 2005. V. 1703. № 2. P. 221–229.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2004.08.017>
27. Alcántara C., Coll-Marqués J.M., Jadán-Piedra C. et al. Polyphosphate in *Lactobacillus* and its link to stress tolerance and probiotic properties // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. 1944.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01944>
28. Celebioglu H.U., Svensson B. Exo- and surface proteomes of the probiotic bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM // *Proteomics.* 2017. V. 17. 11.
<https://doi.org/10.1002/pmic.201700019>
29. Savinova O.S., Glazunova O.A., Moiseenko K.V. et al. Exoproteome analysis of antagonistic interactions between the probiotic bacteria *Limosilactobacillus reuteri* LR1 and *Lactocaseibacillus rhamnosus* F and multidrug resistant strain of *Klebsiella pneumonia* // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. 10999.
<https://doi.org/10.3390/ijms222010999>
30. Jeffery C.J. Intracellular/surface moonlighting proteins that aid in the attachment of gut microbiota to the host // *AIMS Microbiology.* 2019. V. 5. № 1. P. 77–86.
<https://doi.org/10.3934/microbiol.2019.1.77>
31. Oberg T.S., Ward R.E., Steele J.L., Broadbent J.R. Transcriptome analysis of *Bifidobacterium longum* strains that show a differential response to hydrogen peroxide stress // *J. Biotechnol.* 2015. V. 212. P. 58–64.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.405>
32. Basu T.P., Long A.R., Nelson B.J. et al. Complex responses to hydrogen peroxide and hypochlorous acid by the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* // *mSystems.* 2019. V. 4. № 5. e00453-19.
<https://doi.org/10.1128/mSystems.00453-19>
33. Zhai Z., Yang Y., Wang H. et al. Global transcriptomic analysis of *Lactobacillus plantarum* CAUH2 in response to hydrogen peroxide stress // *Food Microbiol.* 2020. V. 87. 103389.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103389>
34. Yan X., Budin-Verneuil A., Verneuil N. et al. Transcriptomic response of *Enterococcus faecalis* V583 to low hydrogen peroxide levels // *Curr. Microbiol.* 2015. V. 70. № 2. P. 156–168.
<https://doi.org/10.1007/s00284-014-0691-8>
35. Calderini E., Celebioglu H.U., Villarreal J. et al. Comparative proteomics of oxidative stress response of *Lactobacillus acidophilus* NCFM reveals effects on DNA repair and cysteine *de novo* synthesis // *Proteomics.* 2017. V. 17. № 5.
<https://doi.org/10.1002/pmic.201600178>
36. Zhang C., Gui Y., Chen X. et al. Transcriptional homogenization of *Lactobacillus rhamnosus* hsryfm 1301 under heat stress and oxidative stress // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2020. V. 104. № 6. P. 2611–2621.
<https://doi.org/10.1007/s00253-020-10407-3>
37. Vermassen A., Leroy S., Talon R. et al. Cell wall hydrolases in bacteria: insight on the diversity of cell wall amidases, glycosidases and peptidases toward peptidoglycan // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. 331.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00331>
38. Al-Hassi H.O., Mann E.R., Sanchez B. et al. Altered human gut dendritic cell properties in ulcerative colitis are reversed by *Lactobacillus plantarum* extracellular encrypted peptide STp // *Mol. Nutr. Food Res.* 2014. V. 58. № 5. P. 1132–1143.
<https://doi.org/10.1002/mnfr.201300596>
39. Siboo I.R., Chambers H.F., Sullam P.M. Role of SraP, a serine-rich surface protein of *Staphylococcus aureus*, in binding to human platelets // *Infect. Immun.* 2005. V. 73. P. 2273–2280.
<https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.2273-2280.2005>
40. Schramm F., Schroeder K., Jonas K. Protein aggregation in bacteria // *FEMS Microbiol. Rev.* 2020. V. 44. P. 54–72.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuz026>
41. Alam A., Bröms J.E., Kumar R., Sjöstedt A. The role of ClpB in bacterial stress responses and virulence // *Front. Mol. Biosci.* 2021. V. 8. 668910.
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.668910>
42. Фетисов С.О. О роли кишечных бактерий в физиологической регуляции аппетита и энергетического обмена // *Интегративная физиология*. 2021. Т. 2. № 1. С. 21–32.
<https://doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-21-32>

Comparative Genomic, Transcriptomic, and Proteomic Analysis of the *Limosilactobacillus fermentum* U-21 Strain, Promising for the Creation of a Pharmabiotic

E. U. Poluektova^{a, *}, D. A. Mavletova^a, M. V. Odorskaya^a, M. V. Marsova^a,
K. M. Klimina^{a, b}, T. A. Koshenko^a, R. A. Yunes^{a, **}, and V. N. Danilenko^a

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

^bFederal Research and Clinical Center for Physical and Chemical Medicine
of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, Moscow, 119435 Russia

*e-mail: epolu@vigg.ru

**e-mail: romanyunes@gmail.com

Today's world is undergoing revolutionary changes in the development and use of pharmacological preparations based on bacteria and their biologically active ingredients. The most promising area of research is that of the development of pharmabiotics – live biotherapeutic drugs and/or their metabolites and components with established pharmacological ingredients, mechanism of action and intended fortreating specific diseases. In order to develop pharmabiotics, aside from traditional microbiological and biotechnological approaches, a complex of omics technologies, genomic, transcriptomic and proteomic, can substantially facilitate the process. In the current study, these technologies were employed to characterize the strain *Limosilactobacillus fermentum* U-21 that was previously selected for a number of unique antioxidant properties. Genomic analysis of the strain made it possible to identify 29 genes, the products of which are likely to exhibit antioxidant properties. The most important genes are those encoding proteins of the thioredoxin complex and those encoding the metabolism and transport of heavy metals. 380 genes showed an increase in expression and 370 genes showed a more than twofold decrease in expression upon exposure to hydrogen peroxide. The genes encoding a putative urea carboxylase operon showed the most dramatic increase in expression reaching 14–24 times. Changes in the expression of transport genes, including Fe²⁺ and Cu²⁺ metal ions, as well as in the synthesis and catabolism of some amino acids, are important for further research. Proteomic analysis of the exoproteome of the strain enabled the identification of the ClpB protein belonging to a chaperone complex, which can play a key role in refolding the misfolded proteins as a result of oxidative stress in various tissues and organs of the animal body. The use of a complex of omics technologies to characterize the therapeutic properties and mechanism of action of the *L. fermentum* U-21 strain is one of the first attempts in this field of research.

Keywords: pharmabiotics, antioxidants, omics technologies, lactobacilli.

УДК 575.1:575.174.015.3:577.213.3

**АРЕАЛ, НАСЕКОМЫЕ-ПЕРЕНОСЧИКИ И ПОЛИМОРФИЗМ
МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК ГАМАЗОВОГО КЛЕЩА *Hoploseius oblongus*
(Mesostigmata, Blattisociidae) – ОБЛИГАТНОГО МИКОБИОНТА ТРУТОВОГО
ГРИБА *Fomitopsis pinicola* (Polyporales, Basidiomycota)**

© 2022 г. Б. В. Андрианов^{1, 3, *}, О. Л. Макарова², И. И. Горячева¹, А. Г. Зуев²

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

²Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

³Московский государственный областной университет, Московская область, Мытищи, 141014 Россия

*e-mail: andrianovb@mail.ru

Поступила в редакцию 27.01.2022 г.

После доработки 03.03.2022 г.

Принята к публикации 10.03.2022 г.

Охарактеризована генетическая изменчивость гамазового клеща *Hoploseius oblongus* Masan & Halliday, 2016, найденного во Франции, Дании, Украине и широко в России, от Кавказа до Заполярья. Этот вид, известный до сих пор по шести находкам в Словакии и Польше, обитает только в гименофоре живых плодовых тел трутового гриба *Fomitopsis pinicola*. Мы изучили 502 живых плодовых тела *F. pinicola* из 62 локалитетов и провели ДНК-штрихкодирование особей *H. oblongus* из 28 локалитетов на территории Европы, Кавказа, Западной и Средней Сибири. Не менее 90% плодовых тел *F. pinicola* в исследованных районах заселены клещом *H. oblongus*. Повсеместно в Западной Палеарктике, вплоть до долины Енисея на востоке, мы наблюдали ассоциацию *F. pinicola* с клещом *H. oblongus*. На всей исследованной нами территории обширного ареала *H. oblongus* характеризуется низкой изменчивостью нуклеотидной последовательности BOLD-фрагмента митохондриального гена *COI* и мотоморфен по нуклеотидной последовательности фрагмента ядерного рибосомного повтора. Низкая генетическая изменчивость указывает на относительно недавнее происхождение популяции *H. oblongus*, возможно связанное с восстановлением лесного пояса Северной Евразии в голоцене. Эффективность расселения *H. oblongus* обеспечивается форезией взрослых клещей на яйцекладущих самках почвенных комариков детритниц (Sciaridae) в конце лета и начале осени. Реже клещи расселяются на взрослых галлицах (Cecidomyiidae) из трибы Brachineurini или на имаго некоторых других мелких видов насекомых из отряда Diptera.

Ключевые слова: *COI*, *ITS*, *5.8S* рРНК ген, Sciaridae, Cecidomyiidae, Gamasina, Phytoseioidea, генетический мономорфизм.

DOI: 10.31857/S0016675822090041

Плодовые тела трутовых грибов, многочисленные и повсеместно встречающиеся в лесной зоне Голарктики, образуют специфическое местообитание для микрофауны, в первую очередь – различных клещей. Экологическая генетика этой микрофауны в настоящее время мало исследована, но сам комплекс микобионтов в последние годы является объектом активного изучения [1–7]. В данном сообщении мы впервые приводим характеристику генетической изменчивости клеща *Hoploseius oblongus* Masan & Halliday, 2016, обитающего в трубочках гименофора живых грибов *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst.

Клещи рода *Hoploseius* Berlese, 1914 населяют преимущественно теплые регионы Земли, в том числе Центральную Америку, тропическую Аф-

рику, Ближний Восток, Юго-Восточную Азию и Австралию. Большинство видов связано с дерево-разрушающими грибами [8]. Род насчитывает 12 видов, из которых лишь три распространены в Южной и Средней Европе [2, 9–12]. Баркодирование видов рода *Hoploseius* ранее не проводилось.

На территории России и Прибалтики клещи рода *Hoploseius* (как *Hoploseius* sp.) указывались неоднократно [1, 13–15]. Недавно этот вид описан как *Hoploseius oblongus* Masan & Halliday, 2016. Все находки *H. oblongus* связаны только с гименофором трутовика окаймленного (*Fomitopsis pinicola*) [1, 11, 13, 15]. Этот вид грибов широко распространен в умеренных и бореальных лесах Северного Полушария, где заселяет различные хвойные и лиственные породы деревьев, наиболее часто *Pi-*

cea spp. и *Betula* spp. [16]. Некоторые плодовые тела *F. pinicola* могут жить до 18 лет [17]. Этот вид гриба активно распространяет бурую гниль [18] и считается основным разрушителем мертвой древесины в Европе [19]. Видовой состав акарофауны *Fomitopsis pinicola* изучался в ряде работ [1, 2, 5, 12–15, 20, 21]. Пути заселения плодовых тел *F. pinicola* клещами-микобионтами ранее не изучались. В роде *Hoploseius* форезия на мелких короткоусых двукрылых показана для трех видов [20, 22]. Переносчики *H. oblongus* ранее не были известны, но их наличие не вызывало сомнений, принимая во внимание особенности биологии данного вида. Местообитание клеща образует в лесу динамичную во времени пространственную мозаику из заселенных клещами и вновь растущих грибов, которые разделены обширными пространствами, непригодными для жизни клещей. Это обстоятельство делает необходимой форезию клещей на летающих насекомых, способных переносить слабо мобильных клещей в новые плодовые тела трутовика.

В данной работе мы впервые проводим баркодирование сборов *H. oblongus* в грибах *F. pinicola* и оцениваем степень генетического единства его обширной популяции, а также уточняем ареал *H. oblongus* на территории Европы и Западной Сибири. Впервые определены группы насекомых, участвующие в расселении *H. oblongus*. Полученные данные позволяют реконструировать основные этапы формирования современного ареала этого узкоспециализированного вида клещей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сборы клещей

Сборы окаймленных трутовиков, *Fomitopsis pinicola*, проводили в 1989–2021 гг. в различных регионах России, а также на территории Украины, Дании и Франции. Анализировались только живые плодовые тела преимущественно средних размеров, возрастом 1–3 года, со светло-желтым или белым гименофором, без признаков повреждения. Грибы отделяли от деревьев, заворачивали в несколько слоев газетной бумаги (оставляя прослойку воздуха над гименофором) и полиэтиленовый пакет и доставляли в лабораторию. Иногда использовалась почтовая пересылка в течение 3–5 дней. Всего изучено 502 плодовых тела из 62 локалитетов. Географическое расположение мест сбора трутовиков представлено на рис. 1. Число грибов в сериях из одного локалитета варьировало от двух до 202 шт. Выгонку клещей проводили в лаборатории в эклекторах из плотной бумаги без специального освещения или подогрева до полного высыхания в течение 10–18 сут. Клещей фиксировали 96%-ным этанолом. Часть определенных по морфологическим признакам особей

H. oblongus была использована в генетических исследованиях. При изготовлении препаратов применяли жидкость Хойера. Определяли процент инфицированных клещом плодовых тел 2–3-летнего возраста и количество особей *H. pinicola* всех стадий развития в каждом плодовом теле, которое пересчитывали на 1 дм² площади гименофора. В ряде районов, представляющих основные климатические зоны в пределах ареала *H. oblongus*, был проведен поиск клещей *H. oblongus* в лесной почве. Пробы почвы отбирали с площади 5 × 5 см², они включали подстилку и собственно почву до глубины 5 см. Выгонку клещей проводили в эклекторах.

Формирование выборки клещей H. oblongus для проведения ДНК-штрихкодирования

Для молекулярного анализа клещей собирали из одного плодового тела гриба. Из общего сбора микроартропод, собранных в эклектор, самок *H. oblongus* выбирали механически в количестве около 50 для одного выделения тотальной ДНК. Возможность применения такого метода сбора клещей связана с особенностями биологии *H. oblongus*. *H. oblongus* не образует стабильного заселения определенного места. Его колонии возникают, очевидно, от единственной самки-основательницы или от небольшой, вероятно родственной, группы клещей, перенесенных на гриб в результате форезии на летающем насекомом-переносчике. Колонии существуют обычно от одного года до четырех лет, пока гриб растет, и исчезают после отмирания гриба. Таким образом, при формировании каждой колонии клещей должен наблюдаться эффект основателя, что связано со снижением генетической изменчивости. В результате клещи из конкретного плодового тела гриба могут рассматриваться как одна митохондриальная линия, которую можно сравнивать с другими митохондриальными линиями из географически удаленных районов. Были обработаны выборки из 28 локалитетов. Места сборов клещей, охарактеризованных с помощью метода ДНК-штрихкодирования, показаны на рис. 1. Описание мест сборов клещей и результат ДНК-штрихкодирования клещей по данным изменчивости нуклеотидной последовательности BOLD-фрагмента митохондриального гена *COI* представлены в табл. 1.

Выделение тотальной ДНК и проведение ПЦР

Тотальную ДНК из самок клещей выделяли фенол-хлороформным методом [23]. Полученную ДНК растворяли в деионизованной воде. Концентрация ДНК определялась спектрофотометрически с использованием Implen NanoPhotometer NP80. Концентрацию ДНК в препаратах выравнивали до 4 нг/мкл. ПЦР проводили в конечном объеме 25 мкл с использованием наборов

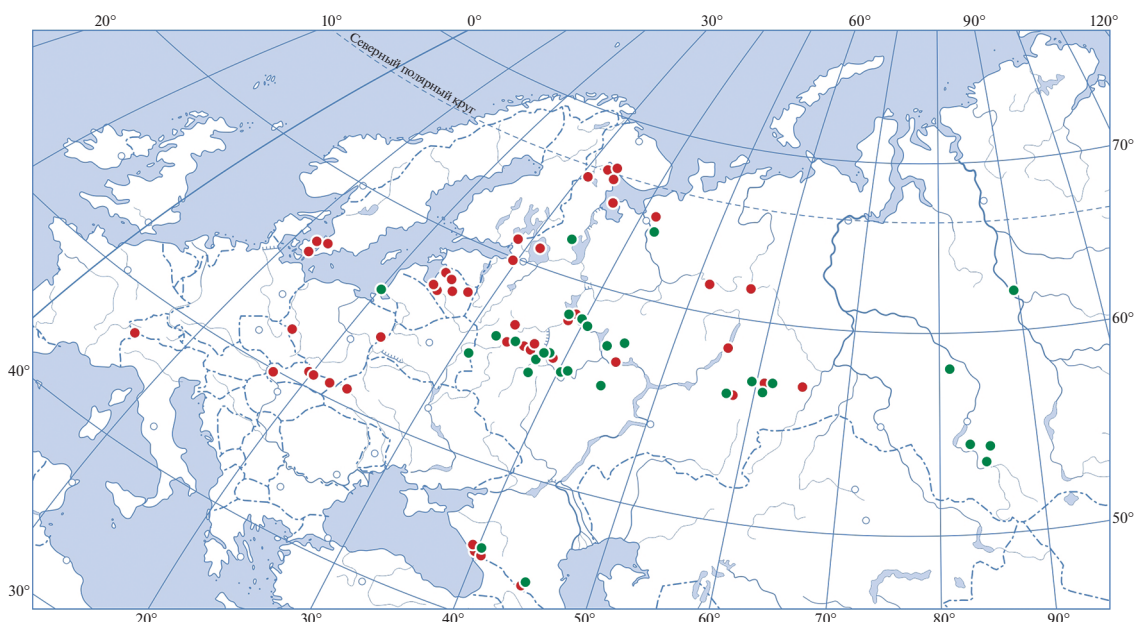


Рис. 1. Географическое расположение районов сборов *H. oblongus*. Красными кружками показаны районы сборов *H. oblongus*, охарактеризованных только по морфологическим признакам клещей; зелеными кружками отмечены районы сборов *H. oblongus*, проанализированных морфологически и методом ДНК-баркодирования.

для амплификации EncycloPlus PCR kit (Евроген, Россия) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Стандартные фолмеровские праймеры LCO1490 и HCO2198 [24] дают нестабильную амплификацию BOLD-фрагмента на матрице тотальной ДНК клещей. Более стабильные результаты дает пара праймеров HOP611F–HCO2198, амплифицирующих укороченный с 5'-конца BOLD-фрагмент длиной 611 пн. Прямой праймер: HOP611F (5'-TATGAGCAGGAATAATTGGAACCT-3'), обратный праймер: HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3'). Праймеры были подобраны с помощью программы Primer3 [25]. Условия ПЦР: первичная денатурация – 3 мин при 94°C; затем 35 циклов: денатурация 94°C – 15 с, отжиг 60°C – 10 с, синтез 72°C – 40 с; и завершающий синтез при 72°C – 7 мин.

Для амплификации фрагмента рибосомного повтора гриба *F. pinicola* мы использовали модифицированный протокол из работы [26]. Праймеры: прямой ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') и обратный ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTTGATATGC-3') амплифицируют фрагмент длиной 625 пн, включающий следующие последовательности: фрагмент ITS1, ген *5.8S* рРНК, ITS2, фрагмент гена *28S* рРНК. Вследствие неожиданно высокой гомологии некоторых фрагментов ядерных рибосомных повторов у гриба и клеща, которую мы обнаружили эмпирически, те же праймеры позволяют амплифицировать аналогичный фрагмент ри-

босомного повтора клещей *H. oblongus* длиной 589 пн. Мы использовали эти праймеры для получения ПЦР-фрагмента, включающего последовательности ITS1, гена *5.8S* рРНК, ITS2 и фрагмента гена *28S* рРНК у клещей *H. oblongus*. Условия ПЦР: первичная денатурация – 3 мин при 94°C; затем 35 циклов: денатурация 94°C – 15 с, отжиг 58°C – 10 с, синтез 72°C – 40 с; и завершающий синтез при 72°C – 7 мин.

Очистка и секвенирование ПЦР-фрагментов

Фрагменты, полученные в результате амплификации, фракционировали в 1.5%-ном агарозном геле. Элюция фрагментов из геля проводилась с использованием набора для элюции Cleanup Mimi (Евроген, Россия) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Нуклеотидную последовательность ПЦР-фрагментов определяли с прямого и обратного праймеров на приборе 3500 Genetic Analyzer с использованием набора реагентов BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) согласно рекомендациям фирмы-производителя.

Биоинформационный анализ

Анализ хроматограмм проводили с помощью программы ChromasPro 13.3 (Technelysium, Australia). Выравнивание последовательностей, полученных в результате секвенирования, с последовательно-

Таблица 1. Сборы клещей *Hoploseius oblongus*, охарактеризованные методом ДНК-штрихкодирования

№ п/п	Регион	Локалитет и (дата сбора)	Имя COI гаплотипа	GenBank ID
1	Московская область	Шаховской р-н, д. Бурцево (30.06.2019)	Karelia_34	MZ686921
2	Московская область	Подольский р-н, Малинская биологическая станция ИПЭЭ РАН (29.12.2019)	Moscow_4	MZ686922
3	Тверская область	Центрально-лесной государственный заповедник (05.01.2020)	Karelia_34	MZ686923
4	Архангельская область	Пинежский р-н (09.01.2015)	Arkhangelsk_12	MZ686924
5	Калининградская область	Куршская коса, Биологическая станция “Фрингилла” ЗИН РАН (17.04.2020)	Curonian_Spit	MZ686925
6	Ярославская область	Некоузский р-н, пос. Борок (08.05.2020)	Yaroslavl_16	MZ686926
7	Нижегородская область	Краснобаковский р-н, д. Старое Дмитриевское (02.05.2020)	N_Novgorod_17	MZ686927
8	Московская область	г. Москва, парк Покровско-Стрешнево (23.04.2020)	Moscow_13	MZ686928
9	Московская область	Пушкинский р-н, пос. Софрино (03.06.2020)	Moscow_18	MZ686929
10	Нижегородская область	Кстовский р-н, пос. Нижегородец (20.06.2020)	N_Novgorod_17	MZ686930
11	Тульская область	Заокский р-н (04.06.2020)	Moscow_13	MZ686931
12	Смоленская область	д. Дубровенка (09.07.2020)	Smolensk_22a	MZ686932
13	Ярославская область	г. Ярославль, Скобыкинский лесопарк (15.07.2020)	Yaroslavl_0	MZ686933
14	Свердловская область	г. Первоуральск, д. Крылосово (15.07.2020)	Enisey_30a	MZ686934
15	Владимирская область	г. Владимир, Загородный парк (17.08.2020)	Karelia_34	MZ686935
16	Свердловская область	г. Полевской (22.08.2020)	Enisey_30a	MZ686936
17	Свердловская область	г. Екатеринбург, парк Березовая роща (04.09.2020)	Moscow_4	MZ686937
18	Пермская область	Суксунский р-н, д. Чекарда (29.08.2020)	Perm_29	MZ686938
19	Средняя Сибирь, среднее течение р. Енисей	пос. Мирное (18.08.2020)	Enisey_30a	MZ686939
20	Томская область	Чаинский р-н, пос. Стрельниково (05.09.2020)	Tomsk_31	MZ686940
21	Алтайский край	пос. Тальменка (01.09.2020)	Altay_32	MZ686941
22	Владимирская область	Собинский р-н (12.09.2020)	Enisey_30a	MZ686942
23	Карелия	Заповедник “Кивач” (26.09.2020)	Karelia_34	MZ686943
24	Нижегородская область	Сокольский р-н, д. Галицкая (27.09.2020)	Moscow_4	MZ686944
25	Алтайский край	д. Сухой Карасук (07.10.2020)	Altay_32	MZ686945
26	Алтайский край	Салаирский Кряж, пос. Казанцево (06.10.2020)	Altay_37	MZ686946
27	Адыгея	Майкопский р-н (09.10.2020)	Adygea_38	MZ686947
28	Северная Осетия	Пригородный р-н (06.01.2021)	Adygea_38	MZ686948

стями, размещенными в базах данных GenBank, было выполнено с использованием ресурсов NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Для проведения кластического анализа использовали программу MEGA7 [27]. Дендрограммы строили методом ближайших соседей (NJ). Статистическую достоверность полученной кластеризации таксонов оценивали при помощи величины бутстрэп-поддержки с числом репликаций 10000. Количественные данные о величине нуклеотидной изменчивости выборки проводили в программе MEGA7 [27].

Медианная сеть митохондриальных гаплотипов была построена в программе PopART [28] с применением алгоритма TCS [29].

Поиск насекомых-переносчиков клещей

Для обнаружения видов насекомых-переносчиков *H. oblongus* были сконструированы ловчие камеры, состоящие из подноса, на котором располагались свежесобранные окаймленные трутовики, и ловчего экрана, расположенного над грибами на высоте нескольких сантиметров. Экран смазывался энтомологическим клеем “Полификс”, размятым в бензиновом растворителе “Галоша”. Толщина слоя клея составляла около 0.1 мм. Экран располагали над свежими плодовыми телами трутовиков таким образом, чтобы он не касался грибов и подноса. Ловчие камеры размещали на открытом воздухе в защищенном от дождя месте, неподалеку от паркового леса в Москве, заселенного окаймленным трутовиком и *H. oblongus*. Можно было ожидать наличия в нем и насекомых-переносчиков *H. oblongus*. Насекомые-переносчики имели возможности залетать в камеры с плодовыми телами трутовиков и свободно покидать их, но часть насекомых прилипала к липкой поверхности ловчего экрана. Плодовые тела сменялись каждые 6–8 дней. В период с 16 мая по 30 сентября 2021 г. осмотр экранов проводили ежедневно под бинокулярным микроскопом. В описанных условиях мелкие насекомые надежно прилипали к экрану, смазанному энтомологическим клеем. Поскольку камеры были приоткрыты, насекомые могли как вылетать из грибов, так и залетать снаружи из соседнего парка. Клещи *H. oblongus* учитывались, если они были обнаружены на насекомых или непосредственно рядом с прилипшими насекомыми. Так как после прилипания насекомого форезирующие клещи способны недолго перемещаться в слое клея, часто наблюдалась следовая дорожка от клеща к насекомому, что позволяло установить факт форезии. Прилипших к экрану насекомых и клещей снимали с помощью иглы, помещали в отдельные пробирки и выдерживали в течение 5–7 дней в бензиновом растворителе, а потом 0.5–3 мес. — в этиловом спирте (96%). Из клещей и насекомых изготавливали постоянные препараты с жидкостью Хойера по стандартной методике, размещая их на одном

стекле для фотографирования. Насекомых определяли до уровня семейства.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ареал *Hoploseius oblongus*

На рис. 1 приведены все известные к настоящему времени места находок *H. oblongus*. В 62 из 74 локалитетов *H. oblongus* был обнаружен впервые. Данные о встречаемости *H. oblongus* в различных частях ареала приведены в табл. 2. Встречаемость *H. oblongus* в трутовиках *F. pinicola* на территории Западной Палеарктики оказалась повсеместно высокой. В различных подзонах равнинной тайги и в смешанных лесах Европы, как и в горных лесах Кавказа и Алтая, клещи были найдены в 90–100% плодовых тел *F. pinicola*. *H. oblongus* является узкоспециализированным видом, обитающим только в плодовых телах *F. pinicola*. Этот вывод следует из анализа многолетних сборов клещей в лесной подстилке тех же биотопов, где собирались плодовые тела трутовиков. В пробах почвы было найдено только 3 экз. *H. oblongus* (табл. 2).

Численность *H. oblongus* на единицу площади гименофора гриба варьирует от одного до 2300 экз./дм² и обычно составляет 50–400 экз./дм². На 1 см² гименофора *F. pinicola* размещаются от 550 до 600 трубочек. Следовательно, при максимальной установленной нами плотности клещей на одного клеща “приходится” 26 трубочек гименофора.

Кроме *Hoploseius oblongus* в плодовых телах *F. pinicola* были обнаружены другие виды гамазовых клещей. Наиболее часто, вместе с *H. oblongus*, встречаются: *Ameroseius fungicolicus* Masan, 1998, *Aceoseius muricatus* Koch, 1839, *Lasioseius ometes* Oudemans, 1903, *Zerconopsis remiger* Kramer, 1876, *Oodinychus ovalis* C.L. Koch, 1839, *Sejus togatus* C.L. Koch, 1836 и клещи из рода *Mycolaelaps*.

ДНК-баркодирование выборки *H. oblongus*

Результат ДНК-баркодирования выборки *H. oblongus* представлен в табл. 1. Всего мы проанализировали 28 образцов ДНК клещей и выявили 16 *COI* гаплотипов, различающихся точковыми однонуклеотидными замещениями. На рис. 2 представлен результат кластеризации полученных нами *COI* митохондриальных гаплотипов с наиболее сходными последовательностями, зарегистрированными в GenBank для других представителей Phytoseioidea (семейства Blattisociidae и Phytoseiidae). Семейство Blattisociidae, к которому принадлежит *H. oblongus*, представлено в GenBank тремя видами рода *Lasioseius* и 34 неидентифицированными точнее последовательностями, полученными в ходе сканирующего исследования фауны микроартропод национального парка “Ontario” в Канаде [30]. Все эти гаплотипы представлены на рис. 2. Обширное семейство Phytoseiidae также представлено на рис. 2 наиболее сходными с *H. oblongus* видами.

Таблица 2. Встречаемость клещей *Norlogeius oblongus* в почве и плодовых телах *Fomitopsis pinicola* в разных природных зонах Евразии

Природная зона/ подзона/ландшафт	Район сборов микроартропод (число биотопов)	Почва		Плодовые тела <i>F. pinicola</i>	
		число проб без <i>H. oblongus</i>	число проб с <i>H. oblongus</i>	число плодовых тел без <i>H. oblongus</i>	число (%) плодовых тел с <i>H. oblongus</i>
Северная тайга	Архангельская область, Пинежский заповедник (9)	84	1	0	13 (100%)
Средняя тайга	Республика Коми, Печоро-Ильчский заповедник (4)	54	1	0	13 (100%)
Южная тайга	Тверская область, Центрально-Лесной заповедник (3)	150	0	2	31 (94%)
	Шаховской р-н, окрестности д. Бурцево (3)	35	0	3	34 (92%)
Смешанные хвойно- широколиственные леса	Московская область, Истринский р-н, окрестности д. Новораково (5)	51	0	3	32 (91%)
	г. Москва, парк Покровско-Стрешнево (2)	49	1	18	184 (91%)
Горные леса Кавказа	Московская область, Подольский р-н, окрестности д. Поляны (4)	65	0	3	30 (91%)
	Северная Осетия, Северо-Осетинский заповедник и окрестности (3)	30	0	0	5 (100%)
Горные леса Алтая	Различные районы Алтайского края и Республики Алтай (34)	880	0	0	5 (100%)

Примечание. Сборы микроартропод из образцов почвы и грибов и идентификация вида *H. oblongus* по морфологическим признакам проведены в период с 1972 по 2021 г. О. Макаровой при участии А. Александровой, М. Антиповой, А. Бабенко, М. Бизина, Н. Владимировой, И. Марченко, Д. Палатова, Л. Поспелова, М. Потапова, О. Рязановой, Е. Слепцовой, О. Стариковой, А. Фомичева, С. Цурикова.

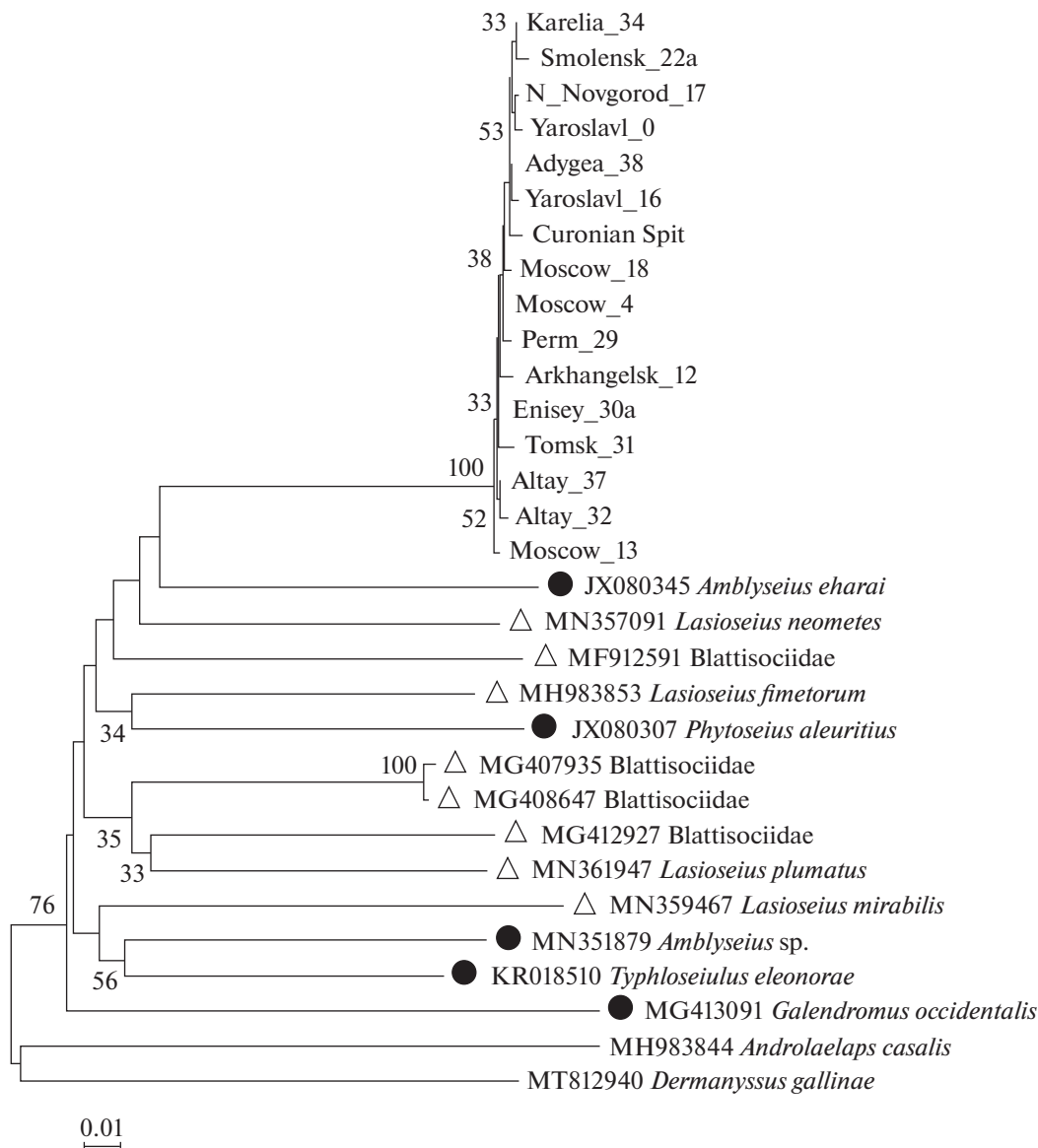


Рис. 2. NJ-дендрограмма BOLD-фрагментов *COI* гаплотипов *H. oblongus* и наиболее сходных по этому признаку представителей семейств Blattisociidae и Phytoseiidae. Последовательности *H. oblongus* обозначены именами гаплотипов, представленных в табл. 1. Нуклеотидные последовательности представителей семейств Blattisociidae (отмечены треугольником) и Phytoseiidae (отмечены кружком) приведены с номерами GenBank. В качестве внешней группы взяты нуклеотидные последовательности *COI Dermanyssus gallinae* и *Androlaelaps casalis*, относящихся к надсемейству Dermanyssoidea. Величины бутстреп-поддержки указаны рядом с узлами дендрограммы.

Следует отметить, что изменчивость нуклеотидных последовательностей митохондриального гена *COI* в пределах этого семейства чрезвычайно велика и заслуживает специального обсуждения. Сравнение нуклеотидных последовательностей гена *COI H. oblongus* и *Phytoseiulus persimilis* (GenBank ID: MW074335), Phytoseiidae, показывает величину дивергенции 74.7%, что больше, чем величина дивергенции нуклеотидных последовательностей гена *COI* при сравнении *H. oblongus* и клещей *Dermanyssus gallinae* и *Androlaelaps casalis*,

относящихся к неродственному надсемейству Dermanyssoidea.

Нуклеотидная изменчивость между гаплотипами *H. oblongus* не превышает 1%. Средняя частота нуклеотидных замен при анализе всей выборки последовательностей *H. oblongus* равна 0.0046 замещений на сайт. Большинство нуклеотидных замещений молчашие. При сравнении продуктов концептуальной трансляции зарегистрированных гаплотипов *H. oblongus* длиной 203 аминокислоты обнаружено пять аминокислотных замещений у трех гаплотипов. Гаплотип

Arkhangelsk_12 характеризуется заменой лейцина на фенилаланин в позиции 151 и лейцина на валин в позиции 177; гаплотип Tomsk_31 характеризуется заменой аланина на валин в позиции 155; и гаплотип Smolensk_22a характеризуется заменой аспарагина на серин в позиции 17 и аланина на треонин в позиции 173. Нормализованное отношение транзиций к трансверсиям (R) равно 5.31. Сравнительно высокая величина этого отношения указывает на наличие сильного стабилизирующего отбора на поддержание структуры гена *COI*.

Рассмотрение дендрограммы на рис. 2 выявляет некоторые необычные особенности кластеризации последовательностей *COI* семейств Blattisociidae и Phytoseiidae. Разделение семейств не поддержано. Представители обоих семейств образуют одну гетерогенную кладу с хорошей бутстреп-поддержкой. Генетические дистанции между кладами *H. oblongus* и *Lasioseius neometes* (обе из Blattisociidae) равно 23%. Такая же дистанция равная 23% разделяет клады *H. oblongus* и *Amblyseius eharai* из Phytoseiidae. Столь большая величина дистанции между двумя родами одного семейства (*Hoploseius* и *Lasioseius*) необычна. Вероятно, систематический ранг рода *Hoploseius* после изучения других представителей рода придется повысить до уровня трибы или выше.

Для характеристики изменчивости нуклеотидных последовательностей ядерного генома *H. oblongus* мы выбрали фрагмент ядерного рибосомного повтора, включающий фрагмент ITS1, ген 5.8S рРНК, ITS2, фрагмент гена 28S рРНК. Мы проанализировали те же образцы *H. oblongus*, которые ранее были взяты для определения митохондриального гаплотипа. Все образцы *H. oblongus* оказались мономорфны по этой последовательности, что подтверждает близкое родство всех популяций *H. oblongus* в Западной Евразии. Так как межвидовые сравнения последовательностей ITS у клещей показывало многочисленные случаи инсерций и делеций, затрудняющих сравнение, мы ограничились сравнением нуклеотидных последовательностей гена 5.8S рРНК, широко используемого в молекулярной систематике. Последовательности 5.8S рРНК известны у 71 вида клещей семейства Phytoseiidae, представляющих 15 родов. Виды каждого из родов семейства Phytoseiidae представлены на рис. 3. Представители семейства Blattisociidae ранее не были охарактеризованы по нуклеотидным последовательностям гена 5.8S рРНК. Полученные данные по изменчивости ядерного гена 5.8S рРНК согласуются с данными по изменчивости митохондриального гена *COI*, и также подтверждают своеобразие *H. oblongus*, соответствующее уровню подсемейства или семейства. Точнее определить таксономический статус *H. oblongus* в отряде Mesostigmata по молекулярным данным в настоящее время не представляется возможным.

Структура генетической изменчивости *H. oblongus*

Для изучения генетической изменчивости *H. oblongus* по ареалу и получения информации об истории расселения вида мы построили медианную сеть митохондриальных гаплотипов. Дендрограммы не подходят для такого анализа, так как исходные допущения модели предполагают, что предковый гаплотип уже вымер, тогда как в случае недавних генетических процессов предковый гаплотип существует и часто является самым массовым. Полученный результат приведен на рис. 4. Популяция с *H. oblongus* слабо структурирована географически. Предковыми гаплотипами можно считать гаплотипы клещей Алтая, так как они меньше дивергировали от наиболее сходного с *H. oblongus* вида *Amblyseius eharai*. Максимальная дивергенция от предковой группы гаплотипов Алтая наблюдается у гаплотипов Smolensk_22a, Curanian_Spit, найденных на крайней западной границе изученной области ареала. Эти наблюдения позволяют предположить направление расширения ареала клещей с юго-востока на северо-запад.

Насекомые-переносчики *Hoploseius oblongus*

Для идентификации насекомых-переносчиков *H. oblongus*, обеспечивающих его расселение между плодовыми телами *F. pinicola*, были сконструированы ловчие камеры, позволяющие отлавливать летающих насекомых, которые посещают плодовые тела трутовиков (см. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ). Всего в период с 16 мая по 30 сентября 2021 г. в ловчих камерах было отловлено 919 особей насекомых, в основном из отрядов Diptera и Coleoptera. Прочие насекомые представлены единичными находками. Распределение пойманных насекомых и клещей по месяцам года представлено на рис. 5. С мая по июнь среди летающих насекомых, посещающих плодовые тела трутовика, преобладали жуки (преимущественно Staphylinidae), но они практически не переносили клещей (табл. 3). С июня и до сентября в сборах преобладали двукрылые. Всего было обнаружено 39 имаго насекомых, переносивших клещей (в том числе 38 – с клещами *H. oblongus*): 35 – представители Diptera (90%), 3 – Hymenoptera (8%), 1 – Coleoptera (3%).

Форезия *H. oblongus* наблюдалась с начала августа по конец сентября с четко выраженным пиком в первой половине сентября (рис. 5). Состав насекомых-переносчиков *H. oblongus*, определенных до семейства, представлен в табл. 3. Из полученных данных можно сделать вывод, что наиболее эффективно форезия *H. oblongus* осуществляется самками комариков из семейства детритниц (Sciaridae). Помимо переноса ими *H. oblongus* установлена форезия двух дейтонимф гамазового клеща *Dendrolaelaps* sp. (Digamasellidae) на самке Sciaridae (от 02.07.2021) и 18 самок клещей из семейства Scutacaridae, Trombidiformes, на другой самке Sciaridae (от 27.08.2021).

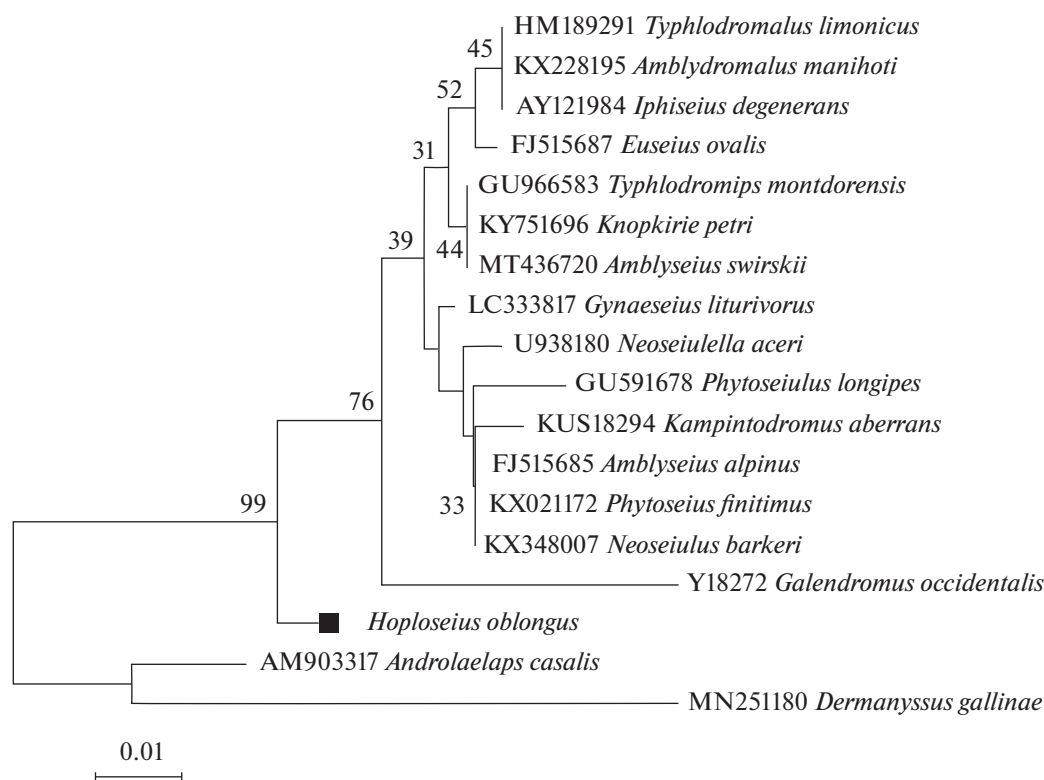


Рис. 3. NJ-дендрограмма 5.8S рРНК генов *H. oblongus* и наиболее сходных по этому признаку представителей семейства Phytoseiidae. Нуклеотидная последовательность 5.8S рРНК гена *H. oblongus*, полученная в настоящей работе, зарегистрирована в GenBank с номером (MZ686432). На дендрограмме она отмечена квадратом. Последовательности клещей, относящихся к семейству Phytoseiidae, приведены с номерами GenBank. В качестве внешней группы взяты последовательности генов 5.8S рРНК клещей *Dermanyssus gallinae* и *Androlaelaps casalis*, относящихся к надсемейству Dermanyssoidea. Величины бутстреп-поддержки указаны рядом с узлами дендрограммы.

Среди 55 экз. *H. oblongus*, полученных с насекомых в ловчих камерах, 9 особей (16%) были самцами, остальные – самками. У каждой третьей самки в сперматеках были видны сперматозоиды.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ареал гамазового клеща *H. oblongus* оказался очень широким, а сам клещ – массовым видом, хотя описан он совсем недавно [11] и до сих пор был известен по единичным находкам в плодовых телах *F. pinicola* [1, 2, 11–15]. Гриб-трутовик *F. pinicola* распространен во всем Северном полушарии [16] и считается основным дереворазрушающим агентом в лесах Центральной Европы [19]. В настоящее время в Европе и Западной Сибири *H. oblongus* заселяет, по-видимому, почти 100% плодовых тел *F. pinicola*. Восточнее Енисея (Хабаровский край, Приморье) до сих пор нами были проанализированы только несколько (7) плодовых тел *F. pinicola*, в которых *H. oblongus* обнаружен не был. Таким образом, ареал *H. oblongus* может быть определен как западно-палеарктический температурный, поскольку этот вид обнаружен в равнинных таежных и смешанных лесах, а также в различных (хвойных, смешанных

и лиственных) горных лесах Европы, Сибири и Кавказа. Ареал гриба-хозяина *F. pinicola* значительно шире – он обычен в таежных лесах Голарктики, но отмечен также в Южной Америке, Африке, Центральной и Юго-Восточной Азии и Австралии, где указывался более чем на 100 видах деревьев [31, 32]. Заселяют ли клещи рода *Hoploseius* трутовик *F. pinicola* на других континентах в настоящее время неизвестно.

Род *Hoploseius* ранее не изучался с точки зрения генетической изменчивости. Мы впервые привели характеристику генетической изменчивости недавно открытого вида клещей *H. oblongus*, обитающего только в трубочках гименофора живых грибов *F. pinicola*. Крайне узкая специализация к пищевому субстрату и особенности популяционной структуры клеща, вероятно, во многом определили характер его генетической изменчивости. Несмотря на огромный ареал и регулярное половое размножение, вид мономорфен по структуре фрагмента ядерного рибосомного повтора и близок к мономорфизму по нуклеотидной последовательности BOLD-фрагмента митохондриального гена *COI*. Мы подтверждаем принадлежность *H. oblongus* к кладе, включающей семейства Blattisociidae или Phytoseiidae, но дальнейший вы-

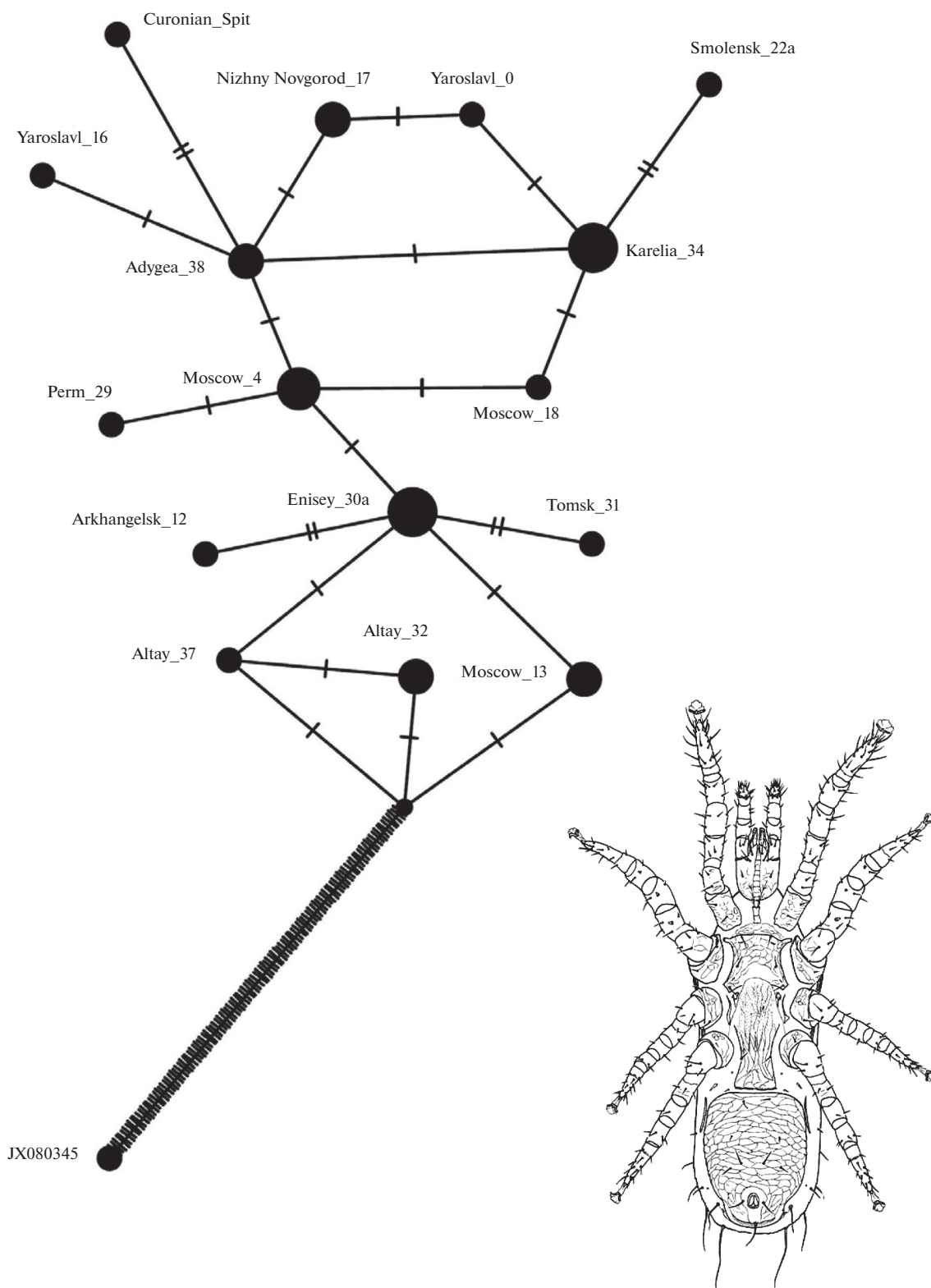


Рис. 4. Медианная сеть *COI* митохондриальных гаплотипов *H. oblongus*. Медианная сеть построена на основе 28 BOLD-фрагментов *COI* клещей *H. oblongus* длиной 611 пн. В качестве внешней группы выбран наиболее сходный с *H. oblongus* по нуклеотидной последовательности BOLD-фрагмента *COI Amblyseius eharai* (GenBank ID: JX080345). Гаплотипы соединены ломаными линиями. Нуклеотидные замены обозначены поперечными отрезками. Минимальное число нуклеотидных замещений, необходимое для преобразования одного гаплотипа в другой, обозначено числом отрезков на соединяющих гаплотипы линиях. Размер кругов пропорционален числу синонимичных последовательностей для данного гаплотипа. GenBank ID гаплотипов *H. oblongus* приведен в табл. 1. Рисунок взрослой самки клеща *H. oblongus* – внизу справа.

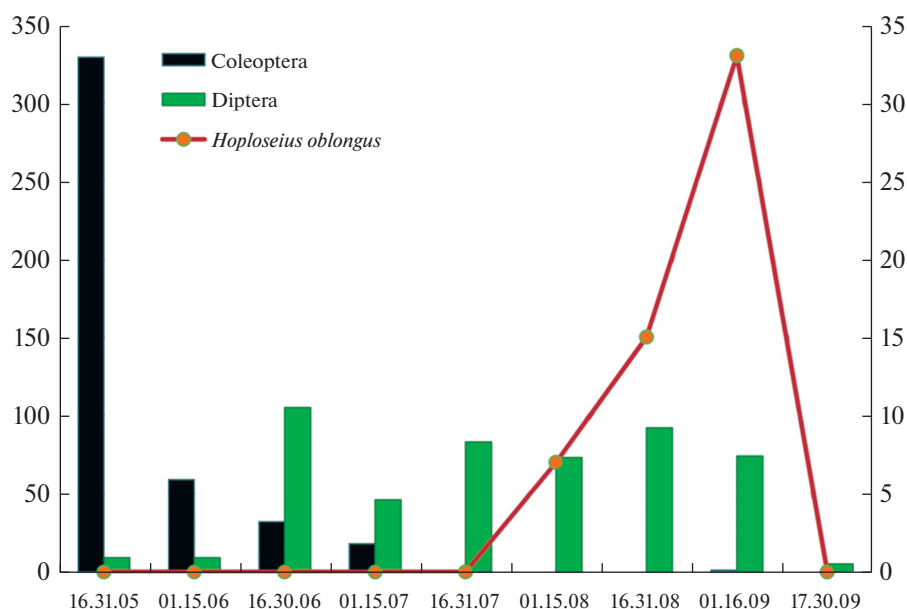


Рис. 5. Динамика числа насекомых и клещей *H. oblongus*, отловленных на стенках ловчих камер с грибами *Fomitopsis pinicola* в сезон 2021 г. (Москва, р-н Сокол). Число имаго пойманных насекомых – потенциальных переносчиков *H. oblongus* обозначено столбиками диаграммы (левая вертикальная ось). Число пойманных клещей *H. oblongus*, форезирующих на насекомых, обозначено кружками, соединенными ломаной линией (правая вертикальная ось).

бор сделать невозможно, так как сами эти семейства подлежат генетико-систематической ревизии. Возможно, род *Hoploseius* принадлежит к особому семейству в отряде Mesostigmata. Изучение митохондриальной изменчивости *H. oblongus* по ареалу, в сочетании с известными историческими данными, позволяет сделать логичные предположения о расселении *H. oblongus* из ледникового рефугиума в районе современного Алтая. Наиболее сильно дивергировавшие от предполагаемого общего предка гаплотипы, характеризующиеся несинонимичными нуклеотидными заменами, найдены в крайне за-

падных и северных из изученных выборок: на территории Смоленской и Архангельской областей.

H. oblongus – облигатный обитатель плодовых тел *F. pinicola* [1, 2, 11, 12, 14, 15], круглогодично заселяющий его живые плодовые тела, где клещ интенсивно размножается с середины мая до конца лета. При одновременных сборах почвенных и грибных клещей в целом ряде районов эти клещи были найдены почти исключительно в плодовых телах *F. pinicola* (табл. 2). Единичные находки *H. oblongus* в почве соответствующих лес-

Таблица 3. Насекомые-переносчики клещей *Hoploseius oblongus*, отловленные ловчими камерами с плодовыми телами трутового гриба *Fomitopsis pinicola* с мая по сентябрь 2021 г., и встречаемость на них клещей (Москва)

Отряд	Семейство	Всего имаго, экз.	Число имаго с клещами	Число насекомых с разным количеством клещей				Доля (%) насекомых с форезирующими клещами
				1	2	3	4	
Diptera	Sciaridae	175	20 (18♀, 2♂)	11	4	3	2	11.4
	Cecidomyiidae	147	7 (5♀, 2♂)	6	1	—	—	4.8
	Phoridae	40	2 (1♀, 1♂)	2	—	—	—	5.0
	Scatopsidae	42	2 (♀)	2	—	—	—	4.8
	Ceratopogonidae	32	2 (1♀, 1♂)	2	—	—	—	6.3
Coleoptera	Staphylinidae	437	2	—	2	—	—	0.2
Hymenoptera	Scelionidae, Encyrtidae	27	3 (♀)	3	—	—	—	11.1

ных местообитаний, очевидно, связаны с падением дерева или с разрушением трутовиков.

Численность *H. oblongus* в гименофоре живых *F. pinicola* варьирует в очень широком диапазоне, но в свежих 2–3-летних плодовых телах она обычно высока (сотни экземпляров в одном грибе). Высокая плотность вида была отмечена также в Словакии [11] и Польше [2, 11, 12]. Рекордное в нашем материале значение плотности *H. oblongus* (2.3 тыс. экз./дм²) сходно со значениями, указанными для другого вида рода — *Hoploseius tenuis* — на полипоровых трутовиках в Мексике [33].

Наиболее частые виды гамазовых клещей, обитающих совместно с *H. oblongus* на трутовике окаймленном, — *Aceosejus muricatus*, *Lasioseius ometes* (Blattisociidae), *Zerconopsis remiger* (Ascidae), *Oodinychus ovalis* (Uropodidae) и *Sejus togatus* (Sejidae) — обитают как в различных грибах, так и в гниющей древесине; их нередко находят в лесной подстилке и растительных компостах [3, 4, 12, 34–36]. Совместное размножение в окаймленном трутовике *H. oblongus* с другими строгими микобионтами (*Ameroseius fungicolis* и *Mycolaelaps* sp.) наблюдается значительно реже [1].

Эффективность расселения *H. oblongus*, несомненно, обеспечена активной форезией самок на насекомых разных отрядов, в первую очередь — на представителях различных групп длинноусых двукрылых (табл. 3). Ранее для трех видов *Hoploseius* в качестве переносчиков указывались короткоусые двукрылые [22] и предполагалась специализированная форезия на Drosophilidae [20]. Самыми массовыми переносчиками *H. oblongus* в нашем материале были представители Sciaridae (51% всех переносчиков) и Cecidomyiidae (18%), целый ряд видов которых развивается в плодовых телах *F. pinicola* [37, 38]. Строгая связь всех выведенных переносчиков с трутовиком *F. pinicola* мало вероятна, хотя галлицу *Camptomyia maxima* Mamaev, 1961 до сих пор выводили только из его плодовых тел [38, 39]. Самый обычный на этих грибах в Фенноскандии вид детритниц — *Lycoriella ingenua* (Dufour) (= *L. solani* Winn.) [38, 40], вредящий культурам шампиньонов по всему миру, может развиваться в самых разных макро- и микромицетах, разлагающейся древесине, гниющих овощах и корнях живых растений [41, 42].

Наличие среди форезирующих самок оплодотворенных и неоплодотворенных особей после зимовки (а зимуют исключительно самки) гарантирует, вероятно, быстрый рост обоуполой популяции весной. Способ размножения этого вида не изучен, но для семейства Blattisociidae в целом характерна гапло-диплоидия (аррентотокция) [43].

Пищевая специализация *H. oblongus* на одном виде трутовиков, *F. pinicola*, парадоксальна, так как род *Fomitopsis* включает около 40 видов, которые не имеют явных и известных особенностей, таких как видоспецифические токсины или пигменты, что позволяло бы объяснить узкую специализацию. Возможной ее причиной могут быть

облигатно необходимые клещу макромолекулы именно данного вида гриба. Дальнейшее изучение данной симбиотической системы с привлечением данных полногеномного секвенирования может быть адекватно для разрешения этого вопроса.

Ареал клеща *H. oblongus* охватывает практически всю Европу и Западную Сибирь, где он обитает во всех подзонах тайги и широколиственных лесах, а также в горных лесах Кавказа и Алтая. Повсеместно вид строго связан с единственным видом трутовых грибов — *F. pinicola*, основным разрушителем мертвой древесины в Европе (среди трутовиков). На всей изученной области ареала *H. oblongus* наблюдается низкая изменчивость нуклеотидных последовательностей ядерного рибосомного повтора и митохондриальной ДНК. Генетическое единство популяции обеспечивается эффективными механизмами расселения клещей на имаго мелких длинноусых двукрылых из семейств детритниц и галлиц. Низкий уровень генетической изменчивости популяции клещей, вероятно, определяется эффектом основателя и сходством экологических условий внутри трубочек грибного гименофора по всему ареалу вида. Квазиоблигатный характер симбиоза *H. oblongus* и *F. pinicola* поднимает вопрос о возможной существенной роли клещей в поддержании жизнеспособности популяции трутовика, имеющего практическое значение.

Исследование выполнено при частичном финансировании РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90192 и всемерной поддержке дирекции ИПЭЭ РАН. Работа А.Г. Зуева поддержана РФФИ (проект № 20-34-90088).

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Все авторы статьи внесли равный вклад в исследование.

В течение многих лет мы получали дополнительный материал от наших коллег и друзей-натуралистов, среди которых А.И. Александрова, М.Д. Антипова, Д.И. Берман, М.С. Бизин, В.И. Булавинцев, Н.А. Булахова, Б.Д. Ефейкин, А.С. Голубцов, А.Р. Громов, Ю.Ю. Давыдова, А.А. Зайцев, Р.А. Захаров, Е.В. Захаров, В.А. Зрянин, А.Ю. Копцева, Д.И. Коробушкин, А.Б. Крашенинников, Е.Д. Лукашевич, А.А. Нехаева, Е.К. Макарова, К.В. Макаров, М.А. Машков, И.Ю. Машкова, Н.С. Морозов, А.А. Нехаева, С.В. Павлова, Д.М. Палатов, И.Н. Панов, М.Б. Потапов, И.Б. Рапопорт, О.Л. Розанова, Е.А. Сидорчук, Л.Л. Случевская, А.Н. Созонтов, Ю.Н. Сундуков, И.С. Турбанов, А.А. Фомичев, О.А. Хрулева, В.В. Худяков, С.М. Цуриков, Б.И. Шефтель. Определение двукрылых проведено или проверено Н.П. Кривошеиной, З.А. Федотовой, А.И. Зайцевым, А.Б. Крашенинниковым,

Е.Д. Лукашевич, М.Б. Мостовским; перепончатокрылых – А.В. Тимоховым. Карта находок выполнена при основном участии К.В. Макарова, им же определены жуки. Многие полевые исследования проведены на территории ООПТ (в том числе в Пинежском, Печоро-Ильчском, Кавказском, Северо-Осетинском и Центрально-лесном заповедниках) при деятельной помощи сотрудников заповедников. Консультации по работе с клеем “Полификс” нами получены от Р.А. Захарова. Всем перечисленным лицам и организациям приносим глубокую благодарность.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Макарова О.Л. Гамазовые клещи (Parasitiformes, Mesostigmata) – обитатели трутовых грибов Печоро-Ильчского заповедника (Республика Коми) // Зоол. журн. 2004. Т. 83. № 11. С. 1335–1340.
2. Gdula A.K., Konwerski S., Olejniczak I. et al. The role of bracket fungi in creating alpha diversity of invertebrates in the Bialowieza National Park, Poland // Ecol. Evol. 2021. V. 11. P. 6456–6470. <https://doi.org/10.1002/ece3.7495>
3. Gwiazdowicz D.J. Ascidi mites (Acari, Mesostigmata) from Selected Forest Ecosystems and Microhabitats in Poland. Poznań: Wydawnictwo Akademii Rolniczej, 2007. 248 p.
4. Gwiazdowicz D.J., Lakomy P. Mites (Acari, Gamasida) occurring in fruiting bodies of Aphyllophorales // Fragm. Funct. 2002. V. 45. P. 81–89. <https://doi.org/10.3161/00159301FF2002.45.1.081>
5. Hagvar S., Amundsen T., Okland B. Mites of the genus *Carabodes* (Acari, Oribatida) in Norwegian coniferous forests: Occurrence in different soils, vegetation types and polypore hosts // Scandinavian J. Forest Research. 2014. V. 29. P. 629–638. <https://doi.org/10.1080/02827581.2014.965195>
6. Masan P., Joharchi O., Abramov V.V. A new genus and two new species of melicharid mites (Acari: Mesostigmata) associated with wood-decaying fungi and mycophagous erotyliid beetles (Coleoptera: Eroteyidae) in Europe // Zootaxa. 2021. V. 4980(1). P. 157–173. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4980.1.10>
7. Salmene I., Brumelis G. Species list and habitat preference of Mesostigmata mites (Acari, Parasitiformes) in Latvia // Acarologia. 2010. V. 50. P. 373–394. <https://doi.org/10.1051/acarologia/20101978>
8. De Moraes G.J., Britto E.P.J., Mineiro J.L. de C., Halliday B. Catalogue of the mite families Ascidae Voigts & Oudemans, Blattisociidae Garman and Melicharidae Hirschmann (Acari: Mesostigmata) // Zootaxa. 2016. V. 4112. P. 1–299. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4112.1.1>
9. Gwiazdowicz D.J. New species of *Hoploseius* Berlese, 1914 (Acari: Gamasida, Ascidae) from Poland // Acta Zool. Acad. Sci. Hung. 2002. V. 48(3). P. 219–224.
10. Plumari M. New records of Ascidae and Blattisociidae species from Italy (Acarina, Mesostigmata) // Atti Soc. it. Sci. nat. Museo civ. Stor. nat. Milano. 2009. V. 150. P. 77–90.
11. Masan P., Halliday B. A new species of *Hoploseius* (Acari: Blattisociidae) associated with the red-belted bracket fungus, *Fomitopsis pinicola* (Polyporaceae) in Slovakia // Systematic and Applied Acarology. 2016. V. 21. P. 1145–1156. <https://doi.org/10.11158/saa.21.8.14>
12. Gdula A.K., Skubała P., Zawieja B., Gwiazdowicz D.J. Mite communities (Acari: Mesostigmata, Oribatida) in the red belt conk, *Fomitopsis pinicola* (Polyporales), in Polish forests // Experimental and Applied Acarology. 2021. V. 84. P. 543–564. <https://doi.org/10.1007/s10493-021-00635-1>
13. Макарова О.Л. Фауна свободноживущих гамазовых клещей (Parasitiformes, Mesostigmata) северной тайги: анализ зональной специфики // Зоол. журн. 2009. Т. 88. № 9. С. 1039–1054.
14. Salmene I. Addition to the Latvian Mesostigmata (Acari, Parasitiformes) check-list // Latvijas Entomologs. 2005. V. 42. P. 72–76.
15. Salmene I. List of Mesostigmata mites (Acari, Parasitiformes) associated with Aphyllophorales fungi (Basidiomycetes) in Latvia // Latvijas Entomologs. 2005. V. 42. P. 45–57.
16. Hogberg N., Holdenrieder O., Stenlid J. Population structure of the wood decay fungus *Fomitopsis pinicola* // Heredity. 1999. V. 83. P. 354–360. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6885970>
17. Hagvar S. How fast do the Tinder Polypore and the Red-banded Polypore grow? // Blyttia. 2008. V. 66. P. 225–230.
18. Lakomy P., Kwasna H. Atlas hub. MULTICO Oficyna Wydawnicza, Warszawa: Multico, 2008. 108 p.
19. Penttillä R., Siitonen J., Kuusinen M. Polypore diversity in managed and old-growth boreal *Picea abies* forests in southern Finland // Biol. Conserv. 2004. V. 117. P. 271–283. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2003.12.007>
20. Lindquist E.E. Remarkable convergence between two taxa of ascid mites (Acari: Mesostigmata) adapted to living in pore tubes of bracket fungi in North America, with description of *Mycolaelaps* new genus // Can. J. Zool. 1995. V. 73. P. 104–128. <https://doi.org/10.1139/z95-013>
21. Maraun M., Augustin D., Müller J. et al. Changes in the community composition and trophic structure of microarthropods in sporocarps of the wood decaying fungus *Fomitopsis pinicola* along an altitudinal gradient // Appl. Soil Ecol. 2014. V. 84. P. 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.06.004>
22. Lindquist E.E. A taxonomic review of the genus *Hoploseius* Berlese (Acarina: Blattisociidae) // Can. Ent. 1963. V. 95. P. 1175–1185. <https://doi.org/10.4039/Ent951175-11>
23. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 479 с.
24. Folmer O., Black M., Hoeh W. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 1994. V. 3. P. 294–297.
25. Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T. et al. Primer3 – new capabilities and interfaces // Nucl. Acids Res. 2012. V. 40. e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
26. White T.J., Bruns T., Lee S. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications / Eds Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. et al. San Diego: Academic Press, 1990. P. 315–322. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>

27. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets // *Mol. Biol. Evol.* 2016. V. 33. P. 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
28. Leigh J.W., Bryant D., Nakagawa S. PopArt: full-feature software for haplotype network construction // *Methods Ecol. Evol.* 2015. V. 6. P. 1110–1116. <https://doi.org/10.1111/2041-210x.12410>
29. Clement M., Posada D., Crandall K.A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies // *Mol. Ecology.* 2000. V. 9. P. 1657–1659. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x>
30. Young M.R., Proctor H.C., deWaard J.R., Hebert P.D.N. DNA barcodes expose unexpected diversity in Canadian mites // *Mol. Ecology.* 2019. V. 28(24). P. 5347–5395. <https://doi.org/10.1111/mec.15292>
31. Perrin P.W. First draft of a monographic card for *Fomitopsis pinicola* (Fr.) Karst, Document, Intern. Research Group on Wood Preservation, Working Group I, Biological Problems (IRG/WP/196). Vancouver: Western forest products lab., 1979. P. 8.
32. Hagvar S. Saproxylic beetles visiting living sporocarps of *Fomitopsis pinicola* and *Fomes fomentarius* // *Norwegian J. Entomol.* 1999. V. 46. P. 25–32.
33. Lindquist E.E. An unusual new species of *Hoploseius* Berlese (Acarina, Blattisociidae) from Mexico // *Can. Ent.* 1965. V. 97(11). P. 1121–1131. <https://doi.org/10.4039/ENT971121-11>
34. Брежетова Н.Г., Вайништейн Б.А., Кадите Б.А. и др. Определитель обитающих в почве клещей Mesostigmata / Под ред. Гилярова М.С. Л.: Наука, 1977. 718 с.
35. Karg W. Acari (Acarina), Miben Parasitiformes (Anactinochaeta), Cohors Gamasina Leach. Raubmilben Die Tierwelt Deutschlands, 59 Teil. Jena; Stuttgart; N.Y.: Gustav Fischer Verlag, 1993. 524 p.
36. Masan P., Walter D.E. Description of the male of *Hoploseius mariae* (Acari, Mesostigmata), an European ascid mite associated with wood-destroying fungi, with key to *Hoploseius* species // *Biologia Bratislava.* 2004. V. 59. P. 527–532.
37. Яковлев Е.Б. Двукрылые Палеарктики, связанные с грибами и миксомицетами. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 1994. 128 с.
38. Okland B., Hagvar S. The insect fauna associated with carpophores of the fungus *Fomitopsis pinicola* (Fr.) Karts. in a southern Norwegian spruce forest // *Fauna Norvegica, Serie B.* 1994. V. 41. P. 29–42.
39. Мамаев Б.М. Галлицы СССР. Сообщение 1. Новые виды рода *Camptomyia* Kieffer (Itonididae, Diptera) // *Зоол. журн.* 1961. Т. 40. № 11. С. 1677–1690.
40. Komonen A. Distribution and abundance of frugivorous insects in the fruiting bodies of *Fomitopsis pinicola* // *Ann. Zool. Fennici.* 2003. V. 40. P. 495–504.
41. Кривошеина Н.П., Зайцев А.И., Яковлев Е.Б. Насекомые – разрушители грибов в лесах Европейской части СССР. М.: Наука, 1986. 310 с.
42. Babytskiy A.I., Moroz M.S., Kalashnyk S.O. et al. New findings of pest sciarid species (Diptera, Sciaridae) in Ukraine, with the first record of *Bradysia difformis* // *Biosyst. Divers.* 2019. V. 27. P. 131–141. <https://doi.org/10.15421/011918>
43. Walter D.E., Lindquist E.E. The distributions of parthenogenetic ascid mites (Acari: Parasitiformes) do not support the biotic uncertainty hypothesis // *Exp. Appl. Acarol.* 1995. V. 19. P. 423–442. <https://doi.org/10.1007/bf00048262>

The Area, Transmitting Insects and Mitochondrial DNA Polymorphism of the Gamasid Mite *Hoploseius oblongus* (Mesostigmata, Blattisociidae), the Obligate Mycobiont on the Bracket Fungus *Fomitopsis pinicola* (Polyporales, Basidiomycota)

B. V. Andrianov^{a, c, *}, O. L. Makarova^b, I. I. Goryacheva^a, and A. G. Zuev^b

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

^bSevertsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

^cMoscow Region State University, Moscow oblast, Mytishi, 141014 Russia

*e-mail: andrianovb@mail.ru

We characterized genetic diversity of the gamasid mite *Hoploseius oblongus* Masan & Halliday, 2016 found in France, Denmark, Ukraine, and widely in Russia, from the Caucasus to the Polar region. This species known so far from six finds in Slovakia and Poland inhabits only the hymenophore of the living fruit bodies of polypore fungus *Fomitopsis pinicola*. We studied 502 living fruit bodies of *F. pinicola* from 62 localities and barcoded individuals of mite *H. oblongus* from 28 localities in Europe, Western and Middle Siberia. At least 90% of fruit bodies of *F. pinicola* in the studied localities are inhabited by the mite *H. oblongus*. In the West Palearctic, up to the Yenisei River valley in the east, we always observed the *F. pinicola* associated with the mite *H. oblongus*. This mite species is characterized by low variability in the nucleotide sequence of the BOLD fragment of the mitochondrial *COI* gene and is monomorphic in the nucleotide sequence of the nuclear ribosomal repeat fragment throughout its vast range that we studied. The low genetic variability indicates a relatively recent origin of the *H. oblongus* population, possibly related to the recovery of the forest belt of northern Eurasia in the Holocene. The dissemination efficiency of *H. oblongus* is ensured by phoresy of adult mites on ovipositing females of dark-winged fungus gnats (Sciaridae) in late summer and early autumn. Less often mites disperse on imago of gall midges (Cecidomyiidae) of the tribe Brachineurini, or on imago of some other small species of Diptera.

Keywords: *COI*, ITS, 5.8S rRNA gene, Sciaridae, Cecidomyiidae, Gamasina, Phytoseioidea, genetic monomorphism.

О ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЕ ПОПУЛЯЦИЙ *Harmonia axyridis* (Coleoptera, Coccinellidae) В НАТИВНОМ И ИНВАЗИВНОМ АРЕАЛАХ — ВЗГЛЯД С ПОЗИЦИЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ

© 2022 г. И. И. Горячева^{1, 2, *}, Д. М. Щепетов^{3, 4}, А. В. Блехман³, И. А. Захаров¹

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

²Московский государственный областной университет, Московская область, Мытищи, 141014 Россия

³Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

⁴Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

*e-mail: iigoryacheva@mail.ru

Поступила в редакцию 31.01.2022 г.

После доработки 21.03.2022 г.

Принята к публикации 12.04.2022 г.

Harmonia axyridis Pallas (1773) (Coleoptera: Coccinellidae) — один из наиболее изученных инвазивных видов насекомых. *H. axyridis* появилась в Европе в 2000 г., и с этого момента продолжается экспансия вида на восток в направлении нативного ареала. Для определения популяций — источников формирования восточного фронта инвазии мы исследовали изменчивость и генетическую структуру инвазивных и нативных популяций вида с помощью 12 микросателлитных маркеров. Мы обнаружили, что в инвазивных популяциях по сравнению с нативными популяциями не произошло снижения средней ожидаемой гетерозиготности, однако наблюдается достоверное снижение аллельного разнообразия. Показано, что аллельное разнообразие в инвазивных популяциях зависит от их “возраста”. Мы обнаружили, что уровень дифференциации инвазивных популяций существенно выше, чем в группе нативных популяций. Кластерный анализ показал, что европейские инвазивные популяции *H. axyridis* делятся на две группы, что свидетельствует об их происхождении в результате нескольких миграционных волн. Наш анализ не показал достоверных различий между группами нативных популяций, что, вероятнее всего, является следствием гомоплазии микросателлитных маркеров, возникшей в ходе эволюции вида. Наши результаты позволяют предположить, что восточный фронт инвазии формируется потомками североитальянского отростка WNA.

Ключевые слова: *Harmonia axyridis*, глобальная инвазия, генетическая структура популяции, микросателлиты.

DOI: 10.31857/S0016675822090090

Harmonia axyridis — один из наиболее изученных инвазивных видов насекомых. Эта крупная хищная кокциnellида в границах своего нативного ареала встречается на обширной территории. В России *H. axyridis* обитает в Сибири, в Амурской области, Хабаровском крае, Приморье, на Сахалине и на Курильских островах [1–3]. Вид широко распространен в Северо-Восточном и Центральном Китае, Японии и Корее [1, 4]. *H. axyridis* встречается также в северо-восточном Казахстане [5], в северной части Монголии [1], на острове Тайвань [6] и в Северном Вьетнаме [7]. Западная граница ареала совпадает со средним течением р. Иртыш в Западной Сибири, а восточная — с побережьем Тихого океана, включая Сахалин и Южные Курилы. На севере ареал вида достигает 57°–58° с.ш., вероятно следуя границам зоны вечной мерзлоты. На юго-западе граница

ареала охватывает лесостепную зону Северо-Восточного Казахстана, затем проходит через верховья р. Иртыш в Северо-Западной Монголии и поворачивает на юг, огибая пустынные и полупустынные районы Монголии и Северо-Западного Китая, а также Тибетское нагорье, достигая провинции Сычуань [8–10].

Глобальная инвазия *H. axyridis* началась с образования в 90-х годах на североамериканском континенте двух плацдармов инвазивных популяций, получивших названия восточного и западного плацдармов (WNA и ENA соответственно), из которых произошло расселение этого вида по территории Северной и Южной Америки, в Европу, Африку и Австралию [11, 12]. В Европе первые сообщения о дикой инвазивной популяции поступили из Германии из Франкфурта-на-Майне в 2000 г. [13]. В период с 2002 по 2006 г. *H. axy-*

ridis распространялась с нарастающей скоростью, показав средний темп прироста 189% (5000 км²) в год с 10000 км² в 2002 г. до 31000 км² в 2006 г. [14]. К 2006 г. вид был обнаружен в Германии, Франции, Великобритании, Польше, Чешской Республике, Австрии и Швейцарии. К 2015 г. *H. axyridis* достигла долготы 37°36′ в центре европейской части России (Москва) и 45°03′ в Краснодарском крае [15]. К настоящему времени вид заселил Кавказ и расселяется по Поволжью, где обнаруживается в районе г. Тольятти на долготе 49°45′ [16]. Таким образом, в Европе (на Евразийском континенте) за 20 лет с момента первого сообщения о находке во Франкфурте *H. axyridis* преодолела расстояние около 3000 км на восток.

Исследование генетической структуры нативных популяций вида по комплексу морфологических признаков показало, что восточная и западная группы популяций различаются на уровне подвидов, при незначительной межпопуляционной изменчивости внутри каждой из них [17, 18]. Анализ полиморфизма митохондриальных молекулярно-генетических маркеров (фрагментов генов *cox1*, *atp6* и D-петли) полностью подтвердил высокий уровень различий между восточными и западными популяциями при минимальной изменчивости внутри групп [19–21].

По данным микросателлитного анализа, нативные популяции также характеризовались значительным уровнем полиморфизма [11, 22] и незначительной генетической дифференциацией внутри западного и восточного кластеров популяций.

Исследования полиморфизма митохондриальных маркеров в инвазивных популяциях Европы показали, что по изменчивости фрагментов гена *atp6* и контрольного региона европейские популяции от Атлантического побережья до Черноморского побережья Кавказа имеют однородную генетическую структуру [22]. Вариабельность гена *cox1* мтДНК в инвазивных европейских популяциях также значительно снижена по сравнению с нативными популяциями, а генетические расстояния между европейскими популяциями минимальны и недостоверны [21]. Американские инвазивные популяции по изменчивости *cox1* еще более однородны [23]. Анализ изменчивости микросателлитов также показал уменьшение уровня гетерозиготности и аллельного разнообразия в инвазивных популяциях [22, 24, 25].

Анализ изменчивости микросателлитов позволил сформулировать гипотезу о происхождении европейских инвазивных популяций. По данным Ломбера с соавт. [24], появление вида в западной части Европы (Бельгия, Франция, Голландия) стало следствием интродукции из восточного североамериканского плацдарма (ЕНА). Эти вселенцы, по всей видимости, смешались с жуками европейской биоконтрольной линии [11]. За-

падный североамериканский плацдарм (WNA) был в свою очередь источником по крайней мере двух независимых интродукций в Европе. Одна из этих интродукций привела к появлению *H. axyridis* в Северной Италии, тогда как вторая интродукция, вероятно, оказалась результатом смешения вселенцев из WNA с ранее образовавшейся инвазивной популяцией восточной и северной частей Западной Европы (Германия, Польша, Чешская Республика, Венгрия, Дания и Норвегия) [24].

Европейский инвазивный ареал *H. axyridis* продолжает активно расширяться на восток. Самой восточной точкой инвазивного ареала *H. axyridis*, в которой были проведены сборы в 2008 г., был венгерский город Батасек (18°41′) [24]. К 2020 г. размножающиеся колонии и скопления зимующих насекомых наблюдались на европейской территории России в городах Рязск – 40°06′, Урюпинск – 42°00′, Нальчик – 43°37′, Махачкала – 47°30′ (личные наблюдения). Крайней восточной находкой вида оказывается географическая точка с координатами 58°13′ с.ш. 52°67′ в.д. вблизи города Глазов в Удмуртии [25]. Таким образом за 12 лет *H. axyridis* продвинулась на восток максимально на 2378 км по прямой. Несмотря на продолжающееся расширение инвазивного ареала, после работ Ломбера с соавт. [11, 22, 24], основанных на сборах из отдельных европейских популяций, сделанных в 2006–2009 гг., генетическая структура европейских инвазивных популяций не исследовалась. Наша работа предпринята с целью восполнить существующий пробел. Поскольку возраст инвазивной популяции имеет существенное значение для максимально точного выявления источников ее формирования, большинство анализируемых нами сборов максимально приближены к моменту вселения *H. axyridis* в соответствующий регион. Кроме того, динамика микроэволюционных процессов в популяциях на фронте инвазивного ареала вызывает особый интерес, поскольку именно в них изменения генетической структуры происходят наиболее быстро как за счет усиления давления естественного отбора в новых для вида местах обитания, так и за счет стохастических процессов.

Низкий уровень изменчивости митохондриальных маркеров, выявленный в инвазивных популяциях, очевидно ограничивает их использование для исследования генетической структуры молодых популяций. Поэтому в настоящей работе мы попытались оценить источники, из которых формировался восточный фронт инвазии, используя данные об изменчивости микросателлитных локусов.



Рис. 1. Места сбора образцов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор образцов

Материалом для данной работы послужили образцы *H. axyridis*, собранные из восьми природных популяций инвазивного ареала и из шести популяций, представляющих западную и восточную группы популяций нативного ареала. Места сбора образцов показаны на карте (рис. 1). Сборы в Турине и Калининграде сделаны в год и на следующий год соответственно после появления *H. axyridis* в этих регионах. Сборы в Денвере и Мюнхене были сделаны раньше, а в Париже и Праге позже, чем сборы из соответствующих регионов, проанализированные в работах Ломбера с соавт. [11, 22, 24]. Пойманных жуков замораживали и хранили при температуре -20°C до выделения ДНК. Подробные данные о коллекторах, местах и датах сбора, количестве выделенных и проанализированных образцов ДНК, а также местах их хранения представлены в табл. 1.

Выделение ДНК

ДНК выделяли из брюшка жука методом фенол-хлороформной экстракции [26]. Концентрацию ДНК в полученных образцах измеряли с помощью NanoDrop8000 (Thermoscientific).

ПЦР и STR-анализ

Для выявления полиморфизма 12 STR-локусов, указанных в табл. 2, были использованы пары праймеров в соответствии с Луазо с соавт. [27].

Реакция амплификации проводилась в конечном объеме 25 мкл на термоциклере AB Veriti 96 well TC (Applied Biosystems, США) при следую-

щих условиях: начальная денатурация — 4 мин при 95°C ; далее пять циклов с использованием функции автодельта: денатурация — 40 с при 95°C , отжиг — 60 с с повышением температуры от 46 до 48°C на 0.5°C в каждом цикле, начиная со второго, полимеризация — 50 с при 70°C ; затем следовали 35 циклов: денатурация — 40 с при 95°C , отжиг — от 60 с с понижением времени на 1 с за каждый цикл, начиная со второго, при 48°C и полимеризация — 60 с при 70°C .

Полученные продукты смешивали, как описано в табл. 2, длину фрагментов оценивали методом капиллярного гель-электрофореза на Applied Biosystems Genetic Analyzer 3500 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, США) в ЦКП ИБР РАН. Полученные данные обрабатывали с помощью программы Gene-Marker [28]. Всего было генотипировано 310 особей из 14 выборок по 12 микросателлитным локусам.

Анализ генетической структуры популяций и межпопуляционных дистанций

Среднюю гетерозиготность (H_e) [29], выровненность (evenesse) [30–32], число аллелей и генетические расстояния (G_{st} sensu Nei) [29] определяли с помощью пакета poppr для R. Для проверки значимости различий G_{st} , Evenesse и средней ожидаемой гетерозиготности (H_e) между выделенными группами популяций использовали T -тест. Кластеризация образцов в предполагаемые популяции с помощью байесовского алгоритма поиска $tmsc$ для найденных кластеров была выполнена с помощью пакета Geneland [33] для R (R Core Team 2017). Анализ был выполнен в пяти независимых итерациях 1000000 MCMC (thinning 100, отжиг 20%) поколений в рамках пространствен-

Таблица 1. Характеристика сборов

Статус популяций	Место сбора	Идентификатор популяции	Географические координаты места сбора	Дата сбора	Число проанализированных образцов (место хранения образцов ДНК)	
Инвазивные	Денвер	Den	39°44'20" с.ш. 104°59'04" з.д.	Сентябрь 2004	32 (1)	
	Мюнхен	Mu	48°08'14" с.ш. 11°34'31" в.д.	Октябрь 2006	11 (1)	
	Берлин	Ber	52°31'27" с.ш. 13°24'37" в.д.	Июль 2008	21 (1)	
	Париж	Par	48°51'12" с.ш. 2°20'55" в.д.	Июнь 2012	8 (1)	
	Турин	Tur	45°04'13" с.ш. 7°41'12" в.д.	Октябрь 2006	23 (2)	
	Прага	Prg	50°05'16" с.ш. 14°25'14" в.д.	Ноябрь 2011	24 (1)	
	Калининград	Kg	54°42'23" с.ш. 20°30'39" в.д.	Август 2010	24 (1)	
	Ялта	Ya	43°35'57" с.ш. 39°43'32" в.д.	Май 2013	25 (2)	
Нативные	западная группа	Новосибирск	Nov	55°02'29" с.ш. 82°56'04" в.д.	Сентябрь 2006	32 (2)
		Горно-Алтайск	GA	51°57'38" с.ш. 85°55'08" в.д.	Сентябрь 2005	8 (1)
		Саяны	Sai	53°42'56" с.ш. 91°25'45" в.д.	Октябрь 2011	32 (2)
	восточная группа	Биробиджан	Bir	48°47'34" с.ш. 132°55'25" в.д.	Осень 2009	24 (2)
		Владивосток	Vl	43°06'20" с.ш. 131°52'24" в.д.	Осень 2009	32 (2)
		Киото	Ki	35°01'15" с.ш. 135°45'13" в.д.	Май 2010	14 (1)

Примечание. Образцы ДНК сохраняются в: 1 – ЦКП “Генетическая коллекция линий насекомых и клеточных культур насекомых” ИОГен РАН, 2 – “Коллекция полиморфных видов Coccinellidae” ИБР РАН.

ной модели и модели коррелированных частот каждая. Все прогоны сходились с наибольшей апостериорной плотностью для четырех предполагаемых кластеров. Для дополнительной оптимизации отнесения отдельных особей к найденным кластерам был выполнен набор из 10 прогонов с фиксированным $K = 4$ по моделям и параметрам, предустановленным разработчиком. Прогон с наибольшим средним логарифмом апостериор-

ной вероятности использовался для всего дальнейшего анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Мультилокусные генотипы были получены для всех образцов. Параметры полиморфизма использованных нами локусов указаны в табл. 3. Все локусы оказались полиморфными с 3–16 (в

Таблица 2. Локусы, праймеры и мультилокусные панели

Локус	Праймеры	Мультилокусная панель и краситель (цифра – номер панели)
H244	F: TGACGGACGCACGAAGAT R: ACAGCTGACCATAGAGGATCG	1 – FAM
H215	F: CGAATCAATAACCCTAGGCG R: AGCGATCTCCTGTTCTACGG	1 – R6G
H605	F: TCCGACGCACAGATAACAGA R: GTTACGTTGACCCGTCGC	1 – TAMRA
H234	F: GCTAAAACCAACGTCAGG R: CTCGCGCGATTATTGGAC	2 – FAM
H194b	F: ACCAGATTGCTGCTTGGATT R: ACAAAATTGGGCGTGAGAAAC	2 – R6G
H253	F: GATACATCGTCCTTTTCAGTCCTC R: CCTGCAAACCTTCCAGACC	2 – TAMRA
H267	F: AACCTGTAATTTCGATTGTGGAAC R: CCGACCTGACCTTTCGTC	3 – FAM
H223	F: TCGTTTAACCGTGATAGGAGAG R: ACGAATTCCGAAAGATGAGG	3 – R6G
H105	F: CGCCTAACAAATAGGCATCAC R: AGGGTGGAGAATGGAATAACC	3 – TAMRA
H201	F: CTTCCGCATCATCCACTAGG R: GTGCGGTCATTAATTCAGGC	4 – FAM
H627	F: CGTAACTTTAACGATCACTCAGC R: GAACATTGTCTTCGCGTGG	4 – R6G
H094	F: TTAGTCGGCGGGTCCATC R: GGGCCGATAAGTCAAACGAG	5 – FAM

Таблица 3. Полиморфизм микросателлитных локусов

Показатель	H244	H215	H605	H234	H253	H194b	H267	H223	H105	H094	H267	H201	Среднее
Число аллелей	16	10	16	13	7	4	8	7	6	3	10	9	9.08
Средняя ожидаемая гетерозиготность (H_e)	0.86	0.8	0.75	0.84	0.27	0.56	0.76	0.41	0.61	0.1	0.84	0.81	0.63
Равномерность (evenesse)	0.79	0.82	0.54	0.83	0.43	0.83	0.74	0.57	0.83	0.42	0.85	0.84	0.71

среднем 9.08) аллелями на локус. Средняя ожидаемая гетерозиготность и равномерность 0.63 и 0.71 соответственно указывают на то, что набор маркеров достаточно информативен для нашего набора образцов.

Внутрипопуляционная изменчивость

Показатели внутрипопуляционной изменчивости представлены в табл. 4.

Среднее число аллелей на локус в нативных популяциях составило 8.17, в том числе 6.67 для

западной популяционной группы и 7.42 для восточной популяционной группы. В инвазивном ареале среднее число аллелей на локус составило 6.50. В европейских популяциях оно колебалось от 3.25 до 4.75 аллелей на локус, а в американской популяции Денвера составило 5.08.

Средняя ожидаемая гетерозиготность (H_e) в совокупности популяций нативного ареала составила 0.582, в том числе 0.573 для западной группы популяций и 0.598 для восточной группы. Средняя ожидаемая гетерозиготность (H_e) в инвазивных популяциях заметно варьирует. В цен-

Таблица 4. Генетическая изменчивость популяций по 12 микросателлитным локусам

Популяции	Число образцов	H_e	Среднее число аллелей на локус
Восточная группа нативных популяций			
Киото	14	0.625	5.00
Владивосток	32	0.591	6.25
Биробиджан	24	0.556	5.17
<i>Киото + Владивосток + Биробиджан</i>	70	0.598	7.42
Западная группа нативных популяций			
Саяны	32	0.569	5.17
Горно-Алтайск	8	0.591	3.92
Новосибирск	32	0.565	5.83
<i>Саяны + Горно-Алтайск + Новосибирск</i>	72	0.573	6.67
Всего для нативных популяций	142	0.582	8.17
Инвазивные популяции			
Денвер	32	0.631	5.08
Берлин	21	0.585	4.75
Мюнхен	11	0.610	4.67
Париж	8	0.609	3.83
Турин	23	0.425	3.25
Прага	24	0.461	3.25
Калининград	24	0.525	3.92
Ялта	25	0.523	4.08
Всего для инвазивных популяций	168	0.627	6.50
Всего	310	0.634	9.08

тральной части Западной Европы (Берлин–Мюнхен–Париж) H_e не опускается ниже 0.585 (Берлин), тогда как в популяциях юга и востока Западной Европы (Турин–Прага–Калининград–Ялта) не превышает 0.525 (Калининград). Средняя ожидаемая гетерозиготность (H_e) в популяции Денвера является максимальной для инвазивных популяций и составляет 0.631. H_e в совокупности инвазивных популяций составила 0.627.

Межпопуляционная изменчивость

Попарное сравнение популяций нативного ареала показало их слабую генетическую дифференциацию, несмотря на значительные географические расстояния (до более 4000 км) и географические барьеры между точками сбора образцов. Попарные оценки G_{st} варьировали от –0.0031 до 0.0081 между популяциями западной группы и от 0.0056 до 0.0316 между популяциями восточной группы (рис. 2).

Среднее значение G_{st} при попарных сравнениях нативных популяций составило 0.013. Среднее значение G_{st} при попарных сравнениях популяций западной и восточной групп составило 0.0032. Среднее значение G_{st} для популяций восточной группы составило 0.0026, для популяций западной группы – 0.0039. Эти различия недостоверны ($t = 2.02$, $d.f. = 2.67$, $p\text{-value} = 0.1473$).

Межпопуляционная дифференциация инвазивных популяций оказалась существенно выше, чем межпопуляционная дифференциация нативных популяций (рис. 2). Среднее значение G_{st} при попарных сравнениях всех инвазивных популяций между собой составило 0.0890. В группе инвазивных популяций значительные различия наблюдаются при сравнении популяций центральной части Западной Европы (Берлин, Мюнхен, Париж) с популяциями южной (Турин) и восточной части Западной Европы (Прага, Калининград, Ялта). G_{st} не превышает значения 0.0576 при попарном сравнении популяций Берлина, Мюн-

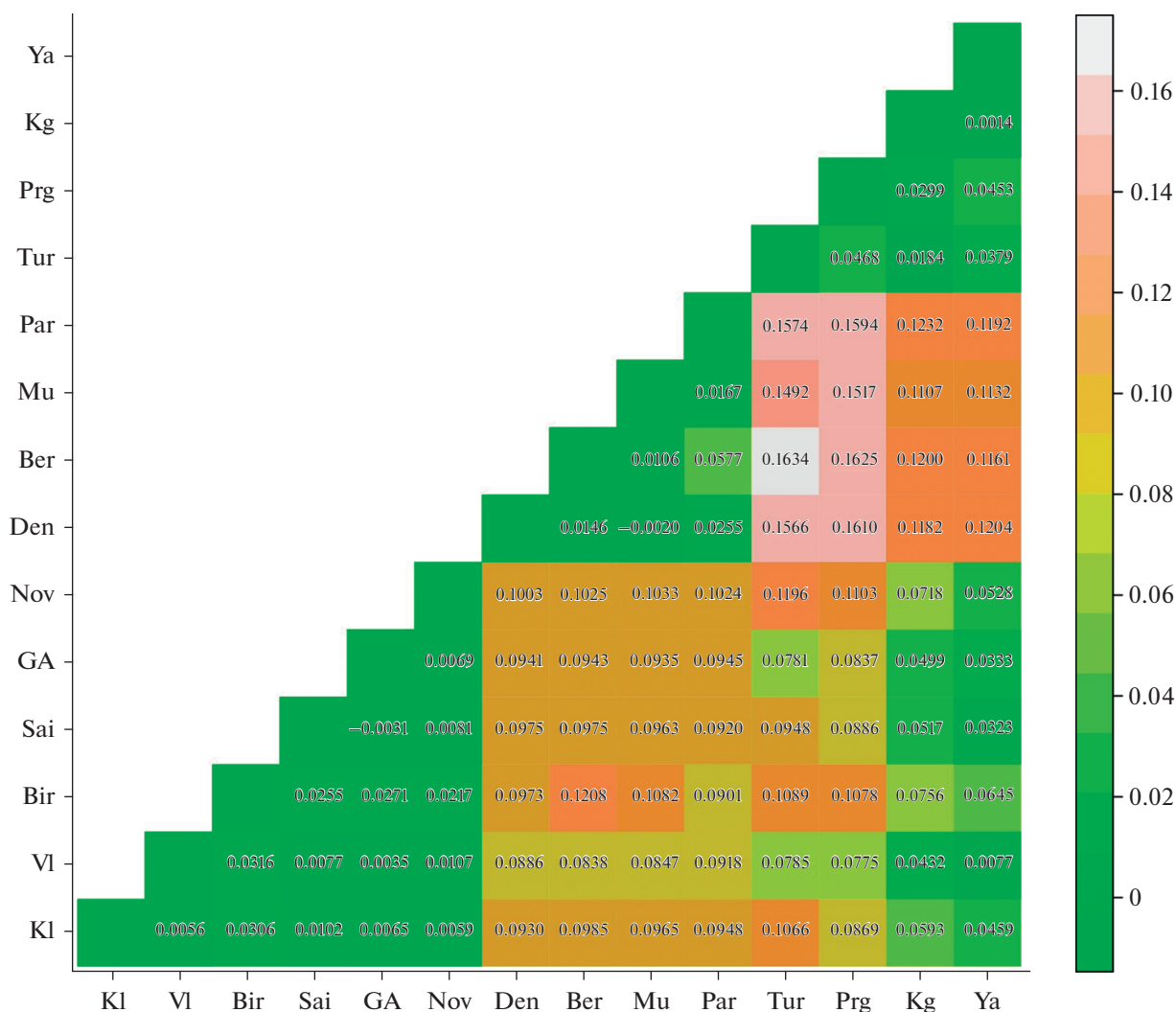


Рис. 2. Межпопуляционная генетическая дифференциация: матрица парных значений G_{st} . Цвет представляет приближительное значение G_{st} как показано на шкале справа, точные значения для пар приведены в виде цифр. Популяции обозначены в соответствии с идентификатором популяций из табл. 1.

хена и Парижа и не опускается ниже значения 0.1107 при попарном сравнении любой из этих популяций с популяциями Праги, Калининграда, Ялты и Турина. В последней группе (Прага, Калининград, Ялта и Турин) G_{st} варьирует от 0.0014 до 0.0467, при этом самые высокие значения G_{st} (0.0299–0.0467) получены при попарном сравнении с популяцией Праги. Попарные сравнения американской популяции Денвера с популяциями Центральной Европы (Париж, Берлин, Мюнхен) показывают их высокое сходство (G_{st} от -0.0020 до 0.0146). Напротив, уровень генетической дифференциации между популяцией Денвера и популяциями Восточной Европы оказывается существенно выше: G_{st} варьирует от 0.1182 до 0.1565.

Различие средних значений G_{st} для групп нативных и инвазивных популяций высоко достоверно: $t = -6.5211$, $d.f. = 30.251$, $p\text{-value} = 3.155e-07$

(0.0000003155). Среднее число аллелей на локус в совокупностях нативных и инвазивных популяций (табл. 4) также различается достоверно ($t = 2.7641$, $d.f. = 9.8753$, $p\text{-value} = 0.02021$). Однако мы не обнаружили достоверных различий в значениях H_e между нативными и инвазивными группами популяций ($t = 0.88138$, $d.f. = 8.8394$, $p\text{-value} = 0.4014$) (табл. 4).

Кластерный анализ индивидуальных образцов выявил четыре предполагаемых кластера (рис. 3), три из которых хорошо соотносятся с точками сборов (или географическими популяциями). Первый кластер, обозначенный зеленым цветом, включает большинство образцов из нативного ареала (за исключением одного образца из Владивостока). Второй (синий) и третий (фиолетовый) кластеры образованы образцами из инвазивных популяций и разделяют их на две группы А и Б,

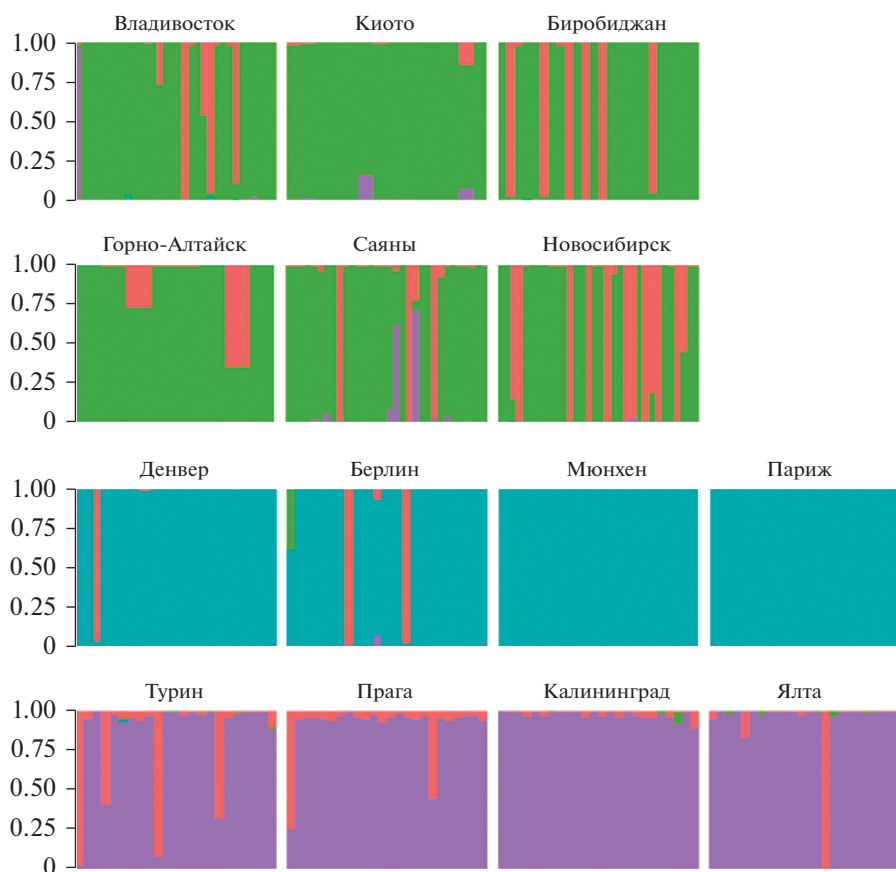


Рис. 3. Генетическая кластеризация образцов *H. axyridis*. Цвет указывает на вероятность принадлежности особи к четырем предполагаемым кластерам. Первый ряд – образцы из восточной группы нативных популяций: Владивосток, Киото, Биробиджан; второй ряд – образцы из западной группы нативных популяций: Горно-Алтайск, Саяны, Новосибирск; третий ряд – образцы из инвазивных популяций Денвера, Берлина, Мюнхена и Парижа (группа А); четвертый ряд – образцы из инвазивных популяций Турина, Праги, Калининграда и Ялты (группа Б). Популяции обозначены в соответствии с идентификатором популяций из табл. 1.

которые соответствуют двум центрам расселения (propagules) в Европе. Образцы четвертого кластера, обозначенного розовым цветом, присутствуют в популяциях как нативного, так и инвазивного ареала.

Различия инвазивных популяционных групп А и Б по значениям G_{st} (0.0205 и 0.0299 соответственно) ($t = -0.86$, $d.f. = 9.78$, $p\text{-value} = 0.4086$) и H_e (0.609 и 0.505 соответственно) ($t = 2.5092$, $d.f. = 3.3249$, $p\text{-value} = 0.0787$) оказываются недостоверными. Однако эти кластеры достоверно различаются по среднему числу аллелей на локус – 4.58 и 3.62 соответственно ($t = 2.7788$, $d.f. = 5.7857$, $p\text{-value} = 0.0333$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Для более точной оценки микроэволюционных процессов, происходящих в популяциях во время расширения инвазивного ареала, мы изучили внутри- и межпопуляционную изменчи-

вость микросателлитов у *H. axyridis*. Для анализа мы использовали сборы насекомых, приближенные к моменту появления вида в той или иной части европейского инвазивного ареала, а также сборы из разных частей нативного ареала. На основании проведенного анализа мы попытались определить источники, из которых формировался современный восточный фронт инвазии.

Наши результаты, представленные в табл. 4, показывают незначительное снижение аллельного разнообразия в инвазивных популяциях по сравнению с нативными популяциями. В то же время среди инвазивных популяций более низкое аллельное разнообразие выявлено в тех популяциях, из которых мы собрали образцы вскоре после появления *H. axyridis* в соответствующем регионе (Турин, Калининград, Ялта). Вероятнее всего снижение аллельного разнообразия в самых молодых инвазивных популяциях (т.е. недавно появившихся на новой территории) является следствием эффекта основателя.

Среди инвазивных популяций наибольшее среднее число аллелей на локус было обнаружено в популяции Денвера, расположенного в штате Колорадо, в предполагаемой зоне контакта двух североамериканских плацдармов – восточного (ENA) (1988) и западного (WNA) (1991) [24]. Высокие значения аллельного разнообразия также были обнаружены в популяциях Берлина и Мюнхена. В обоих случаях сборы проанализированных нами жуков были сделаны через пять или более лет после появления *H. axyridis* в соответствующих регионах – штате Колорадо [34] и Германии. Повышенное аллельное разнообразие в этих популяциях очевидно может быть следствием процессов смешивания инвазивных популяций в результате миграций, а также, возможно, повторных интродукций. В отличие от аллельного разнообразия средняя ожидаемая гетерозиготность в инвазивных популяциях снижается незначительно. Более того, в популяциях Берлина, Мюнхена и Парижа, наиболее близких к североамериканскому ядру инвазии, наблюдается тенденция к увеличению гетерозиготности. Наши результаты хорошо согласуются с известным теоретическим предположением о том, что аллельное разнообразие более чувствительно к бутылочному горлышку и его потеря оказывается несколько выше, чем потеря гетерозиготности [35, 36]. Изучение молекулярно-генетической внутривидовой изменчивости около 70 интродуцированных видов из разных таксономических групп показало, что гетерозиготность их инвазивных популяций в большинстве случаев снижается по сравнению с исходными популяциями на 18.7%. Однако есть виды, у которых стохастическая потеря изменчивости из-за эффекта основателя компенсируется многократной реинтродукцией [36]. Очевидно, что *H. axyridis* относится к таким видам, так же как *Coccinella septempunctata*, для которой было показано, что значительный уровень изменчивости митохондриального гена *COI* в инвазивных популяциях является результатом многократных интродукций [37].

Результаты попарного сравнения популяций по коэффициенту дифференциации G_{st} , представленные на рис. 2, и кластерного анализа, представленного на рис. 3, показывают, что изученные инвазивные популяции дифференцируются на два кластера. Первый кластер – северный – включает популяции Берлина, Мюнхена и Парижа, а также популяцию Денвера; второй кластер – юго-восточный – включает популяции Турина, Праги, Калининграда и Ялты. Выявленная нами кластеризация подтверждает выводы Ломбера с соавт. о происхождении европейских инвазивных популяций *H. axyridis* в результате нескольких миграционных волн [24]. Состав юго-восточного кластера позволяет предположить, что популяции Калининграда и Ялты были сформированы потомками мигрантов южно-европейского ядра,

источником которого был североитальянский отросток WNA. Поскольку популяции Калининграда и Ялты являются самыми восточными из изученных инвазивных популяций, можно предположить, что именно эта группа движется в настоящее время на восток, формируя восточный фронт инвазии.

У нас нет достаточных данных, чтобы сделать однозначный вывод о причинах объединения популяций Денвера в один кластер с популяциями Северной Европы. На наш взгляд сходство этих популяций может быть объяснено событиями смешивания, произошедшими как во время формирования популяции Денвера (между мигрантами двух американских плацдармов), так и во время формирования популяций в Северной Европе в результате неоднократных интродукций [11, 19, 24].

Данные о современной внутривидовой структуре *H. axyridis*, полученные ранее на основе исследования комплекса морфологических и митохондриальных признаков, показали, что западная и восточная группы нативных популяций, сформировавшиеся под влиянием глобальных климатических изменений плейстоцена и начала голоцена, различаются на уровне подвидов [17, 18, 21]. Однако полученные нами результаты анализа изменчивости микросателлитных маркеров свидетельствуют о том, что все нативные популяции образуют единый кластер. Мы можем объяснить выявленное нами отсутствие различий между западной и восточной группами нативных популяций явлением гомоплазии микросателлитных маркеров. Теоретические основы возникновения и эволюционных последствий гомоплазии были подробно рассмотрены ранее [38]. Во время Сартанского оледенения (последнего в плейстоцене), которое датируется периодом в 35–10 тыс. лет назад с максимумом похолодания в 20–18 тыс. лет назад [39–41], видовой ареал *H. axyridis* распался на два длительно изолированных рефугиума (восточный и западный), из которых с наступлением потепления происходило расширение восточного ареала вплоть до восстановления его целостности в голоцене [9, 18]. По всей видимости, за время изоляции в эволюционном прошлом вида в рефугиумах накопилось достаточное для возникновения гомоплазии количество ступенчатых мутаций в использованных нами микросателлитных локусах, что и отразилось в объединении образцов нативных популяций в единый кластер. В то же время по данным Ломбера с соавт. [11, 22, 24] нативные популяции делятся на два кластера, соответствующих восточной и западной группам. По всей видимости, причиной расхождений наших результатов стали разные модели, использованные в кластерном анализе. Ломбером была использована модель смешивания с коррелированными частотами аллелей и местом отбора проб в качестве предварительной информации [42]. Мы провели наше исследование, используя про-

странственную модель, в которой место сбора не учитывалось в качестве приоритетной информации, так как ранее было показано, что анализ на основе местоположения может приводить к смещению распределения образцов по кластерам [43].

В целом, основываясь на наших результатах, можно сказать, что европейским группам инвазивных популяций удалось сохранить достаточно высокий уровень внутрипопуляционной генетической изменчивости, что в соответствии с генетической теорией естественного отбора [44], может определять высокую жизнеспособность *H. axyridis* в новых местообитаниях.

Обсуждая дальнейшее развитие инвазии *H. axyridis* на Евразийском континенте, следует отметить, что с момента своего появления в Северной Италии в 2006 г. вид к 2021 г. продвинулся на восток на более чем 3300 км. До западной границы нативного ареала *H. axyridis* [10] осталось преодолеть чуть более 1000 км. В связи с этим возникает очень интересный вопрос о возможности смыкания инвазивного и нативного ареалов. Если это произойдет, то будущая контактная зона окажется исключительно привлекательным объектом для различных микроэволюционных исследований.

Авторы выражают благодарность Е.Я. Фрисману и В.П. Кораблеву за предоставленные выборки *H. axyridis* из Биробиджана и Владивостока.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта РНФ 16-16-00079_П.

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. Dobrzansky Th. Die geographische und individuelle Variabilität von *Harmonia axyridis* // Biol. Zbl. 1924. V. 44. № 6. P. 401–421.
2. Кузнецов В.Н. Жуки-кокциnellиды (Coleoptera, Coccinellidae) Дальнего Востока России. Ч. 1–2. Владивосток: Дальнаука, 1993. 334 с.
3. Кузнецов В.Н., Семьянов В.П. Эколого-фаунистический обзор кокциnellид (Coleoptera, Coccinellidae) острова Сахалин // Систематика и эколого-фаунистический обзор отдельных отрядов насекомых Дальнего Востока. Владивосток, ДВНЦ АН СССР, 1983. С. 3–15.
4. Komai T. Genetics of ladybeetles // Adv. Genet. 1956. V. 8. P. 155–188.
5. Савойская Г.И. Определитель кокциnellид Казахстана (Col., Coccinellidae) // Тр. Казах. НИИ защиты растений. Алма-Ата. 1972. Т. II. С. 45–73.
6. Кузнецов В.Н., Прошалькин М.Ю. К фауне жуков-кокциnellид (Coleoptera, Coccinellidae) Курильских островов // Евразийский энтомолог. журн. 2006. Т. 5. № 4. С. 264–270.
7. Orlova-Bienkowskaja M.J., Ukrainsky A.S., Brown P.M. *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) in Asia: A re-examination of the native range and invasion to southeastern Kazakhstan and Kyrgyzstan // Biol. Invasions. 2015. V. 17. P. 1941–1948.
8. Воронцов Н.Н., Блехман А.В. Ареал и внутривидовая структура божьей коровки *Harmonia axyridis* Pall., 1773 (Coleoptera, Coccinellidae) // Эволюция, экология, биоразнообразие: Материалы конф. памяти Н.Н. Воронцова (1934–2000). М., 26–27 декабря 2000 г. М.: Издат. отдел УНЦДО, 2001. С. 150–156.
9. Блехман А.В. Внутрипопуляционная и географическая изменчивость широкоареального вида *Harmonia axyridis* Pallas по комплексу полиморфных признаков: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: Ин-т биологии развития РАН, 2009. 24 с.
10. Блехман А.В., Горячева И.И. Нативный ареал и биологические особенности инвазивной божьей коровки *Harmonia axyridis* // Успехи соврем. биологии. 2016. Т. 136. С. 461–471.
11. Lombaert E., Guillemaud T., Cornuet J.-M. et al. Bridgehead effect in the worldwide invasion of the biocontrol harlequin ladybird // PLoS One. 2010. V. 5. Iss. 3. e9743. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009743>
12. Camacho-Cervantes M., Ortega-Iturriaga A., Del-Val E. From effective biocontrol agent to successful invader: The harlequin ladybird (*Harmonia axyridis*) as an example of good ideas that could go wrong // Peer J. 2017. Iss. 5. e3296. <https://doi.org/10.7717/peerj.3296>
13. Klausnitzer B. *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) in Germany (Col., Coccinellidae) // Entomol. Nachr. Ber. 2002. V. 46. P. 177–183.
14. Roy H.E., Brown P.M.J., Adriaens T. et al. The harlequin ladybird, *Harmonia axyridis*: global perspectives on invasion history and ecology // Biol. Invasions. 2016. V. 18. P. 997–1044. <https://doi.org/10.1007/s10530-016-1077-6>
15. Орлова-Беньковская М.Я. Массовое размножение божьей коровки *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) (Coleoptera, Coccinellidae) на Кавказе и возможные источники инвазии // Рос. журн. биологических инвазий. 2014. № 3. С. 73–81.
16. Ruchin A.B., Egorov L.V., Lobachev E.A. et al. Expansion of *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) (Coleoptera: Coccinellidae) to European part of Russia in 2018–2020 // Baltic J. Coleopterology. 2020. V. 20. Iss. 1. P. 51–60.
17. Блехман А.В., Горячева И.И., Захаров И.А. Внутривидовая дифференциация *Harmonia axyridis* Pall. по комплексу морфологических полиморфных признаков и изменчивости митохондриального гена *coi* // Вестн. Моск. ун-та. Биология. 2010. Т. 65. № 4. С. 50–53.
18. Блехман А.В. Современная структура широкоареального вида божьих коровок *Harmonia axyridis* (Coleoptera, Coccinellidae) и возможные причины ее формирования // Зоол. журн. 2014. Т. 93. № 7. С. 857–867.

19. Андрианов Б.В., Горячева И.И., Романов Д.А., Захаров И.А. Особенности митохондриальной изменчивости нативных и инвазивных популяций *Harmonia axyridis* (Coleoptera, Coccinellidae) // Генетика. 2018. Т. 54. № 11. С. 1309–1315. <https://doi.org/10.1134/S0016675818110024>
20. Андрианов Б.В., Романов Д.А., Горелова Т.В., Горячева И.И. Полиморфизм контрольного региона митохондриальной ДНК нативных и инвазивных популяций *Harmonia axyridis* (Coleoptera, Coccinellidae) // Генетика. 2019. Т. 55. № 7. С. 819–825. <https://doi.org/10.1134/S0016675819070038>
21. Blekhtman A., Goryacheva I., Schepetov D., Zakharov I. Variability of the mitochondrial CO1 gene in native and invasive populations of *Harmonia axyridis* Pall. comparative analysis // PLoS One. 2020. V. 15. Iss. 4. P. 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231009>
22. Lombaert E., Guillemaud T., Thomas C.E. et al. Inferring the origin of populations introduced from a genetically structured native range by approximate Bayesian computation: case study of the invasive ladybird *Harmonia axyridis* // Mol. Ecol. 2011. V. 20. P. 4654–4670. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05322.x>
23. Greenstone M., Vandenberg N., Hu J. Barcode haplotype variation in north American agroecosystem lady beetles (Coleoptera: Coccinellidae) // Mol. Ecol. Resour. 2011. V. 11. Iss. 4. P. 629–637. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03007.x>
24. Lombaert E., Guillemaud T., Lundgren J.R. et al. Complementarity of statistical treatments to reconstruct worldwide routes of invasion: the case of the Asian ladybird *Harmonia axyridis* // Mol. Ecol. 2014. V. 23. P. 5979–5997. <https://doi.org/10.1111/mec.12989>
25. Zakharov I., Ruchin A., Egorov E. et al. Invasion of the Asian ladybird *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) in the European part of Russia // Front. Conserv. Sci. 2021. V. 2:739313. <https://doi.org/10.3389/fcosc.2021.739313>
26. Sambrook J.F., Russell D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual / Ed. Russell D.W. Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001. 2100 p.
27. Loiseau A., Malausa T., Lombaert E. et al. Isolation and characterization of microsatellites in the harlequin ladybird, *Harmonia axyridis* (Coleoptera, Coccinellidae), and cross-species amplification within the family Coccinellidae // Mol. Ecol. Resour. 2009. V. 9. P. 934–937. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02517.x>
28. Hulce D., Li X., Snyder-Leiby T., Liu C.S.J. GeneMarker® genotyping software: Tools to increase the statistical power of DNA fragment analysis // J. Biomol. Tech. 2011. V. 22. S35.
29. Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations // PNAS. 1973. V. 70. Iss. 12. P. 3321–3323. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.12.3321>
30. Pielou E. Ecological Diversity. N.Y.: Wiley, 1975. 165 p.
31. Ludwig J., Reynolds J. Statistical Ecology: A Primer on Methods and Computing. N.Y.: Wiley-Inte, 1988. 337 p.
32. Grünwald N.J., Goodwin S.B., Milgroom M.G., Fry W.E. Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms // Phytopathology. 2003. V. 93. Iss. 6. P. 738–746. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.6.738>
33. Guillot G. Inference of structure in subdivided populations at low levels of genetic differentiation – The correlated allele frequencies model revisited // Bioinformatics. 2008. V. 24. Iss. 19. P. 2222–2228. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn419>
34. Koch R.L., Venette R.C., Hutchison W.D. Invasions by *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) in the Western Hemisphere: Implications for South America // Neotrop. Entomol. 2006. V. 35. Iss. 4. P. 421–434. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2006000400001>
35. Nei M. Molecular Population Genetics and Evolution. Amsterdam: Amer. Els. Publ. Co., 1975. 275 p.
36. Dlugosch K.M., Parker I.M. Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and role of multiple introductions // Mol. Ecol. 2008. V. 17. P. 431–449. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03538.x>
37. Kajita Y., O'Neill E., Zheng Y. et al. A population genetic signature of human releases in an invasive ladybeetle // Mol. Ecol. 2012. V. 21. P. 5473–5483. <https://doi.org/10.1111/mec.12059>
38. Estoup A., Jarne P., Cornuet J.M. Homoplasmy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis // Mol. Ecol. 2002. V. 11. P. 1591–1604. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2002.01576.x>
39. Величко А.А. Общие особенности изменений ландшафтов и климата Северной Евразии в кайнозой // Изменение климата и ландшафтов за последние 65 миллионов лет (кайнозой: от палеоцена до голоцена). М.: ГЕОС, 1999. С. 219–233.
40. Еникеев Ф.И. Плейстоценовые оледенения восточного Забайкалья и юго-востока средней Сибири // Геоморфология. 2009. № 2. С. 33–49.
41. Волкова В.С., Михайлова И.В. Природная обстановка и климат в эпоху последнего (Сартанского) оледенения Западной Сибири (по палинологическим данным) // Геология и геофизика. 2001. Т. 42. С. 678–689.
42. Hubisz M.J., Falush D., Stephens M., Pritchard J.K. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information // Mol. Ecol. Resour. 2009. V. 9. P. 1322–1332. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02591.x/full>
43. Wang J. The computer program Structure for assigning individuals to populations: easy to use but easier to misuse // Mol. Ecol. Resour. 2017. V. 17. P. 981–990. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12650>
44. Fisher R.A. The Genetical Theory of Natural Selection. Oxford: Clarendon Press, 1930. 272 p.

The Genetic Structure of *Harmonia axyridis* (Coleoptera, Coccinellidae) Populations from Native and Invasive Ranges from a Position of the Molecular Genetics

I. I. Goryacheva^{a, b, *}, D. M. Schepetov^{c, d}, A. V. Blekhman^c, and I. A. Zakharov^a

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

^bMoscow Region State University, Moscow oblast, Mytishchi, 141014 Russia

^cKoltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

^dLomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: iigoryacheva@mail.ru

Harmonia axyridis Pallas (1773) (Coleoptera: Coccinellidae) is one of the most studied invasive insect species. *H. axyridis* appeared in Europe in 2000, and since then the expansion of the species eastward in the direction of its native range has continued. To determine the source populations of the formation of the eastern front of invasion, we investigated the variability and genetic structure of invasive and native populations of the species using 12 microsatellite markers. We found that there was no decrease in average expected heterozygosity in invasive populations compared to native populations, but there was a significant decrease in allelic diversity. Allelic diversity in invasive populations has been shown to depend on their “age”. We found that the level of differentiation in invasive populations is significantly higher than in the group of native populations. Cluster analysis showed that European invasive populations of *H. axyridis* are divided into two groups, indicating their origin as a result of several migration waves. We found no significant differences between the western and eastern groups of native populations, which is most likely a consequence of the homoplasy of microsatellite markers resulting from the evolutionary past of the species. Our results suggest that the eastern invasion front is formed by descendants of the northern Italian WNA propagule.

Keywords: *Harmonia axyridis*, global invasion, population genetic structure, microsatellites.

УДК 575.16

ВАРИАНТ rs7579411 ГЕНА *LHCGR* АССОЦИИРОВАН С РАЗВИТИЕМ ГИПЕРПЛАЗИИ ЭНДОМЕТРИЯ

© 2022 г. И. В. Пономаренко¹, И. В. Батлущая¹, В. С. Орлова¹,
О. А. Ефремова¹, М. И. Чурносов¹, *

¹Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, 308015 Россия

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

Поступила в редакцию 04.12.2021 г.

После доработки 22.12.2021 г.

Принята к публикации 28.12.2021 г.

Изучены ассоциации однонуклеотидного полиморфизма гена *LHCGR* с формированием гиперплазии эндометрия у населения России. Проведено генотипирование четырех локусов гена *LHCGR* (rs4953616, rs4374421, rs6729809, rs7579411) у 520 больных с гиперплазией эндометрия (ГЭ) и 981 женщины группы контроля. Установлен значимый вклад в подверженность гиперплазии эндометрия полиморфного варианта rs7579411 гена *LHCGR*. Генотип C/C rs7579411 гена *LHCGR* является рисковым для ГЭ (OR = 1.26, $p = 0.05$), тогда как аллельный вариант T rs7579411 гена *LHCGR* – протективный фактор для ГЭ (OR = 0.79, $p_{\text{perm}} = 0.05$). Локус rs7579411 гена *LHCGR* обладает значимыми эпигенетическими эффектами (находится в регионах ДНК, маркирующих регуляторные последовательности (энхансеры)) и связан с экспрессией гена *STON1-GTF2AIL* в органах и тканях (щитовидная железа, периферическая кровь), вовлеченных в патофизиологию заболевания. При этом аллель T rs7579411 гена *LHCGR* ассоциирован с низкой транскрипционной активностью гена *STON1-GTF2AIL* ($\beta = -0.25$).

Ключевые слова: гиперплазия эндометрия, *LHCGR*, полиморфизм, ассоциации.

DOI: 10.31857/S0016675822090132

Гиперпластические процессы эндометрия (ГЭ) характеризуются патологически измененной пролиферацией (очаговой или диффузной) различных компонентов слизистого слоя матки (железистого/стромального) при преобладающем поражении железистых структурных элементов [1, 2]. Распространенность ГЭ среди различных групп женского населения варьирует в широких пределах, и в структуре гинекологической патологии доля данного заболевания может достигать 50% [3, 4]. Считается, что ГЭ без атипии чаще встречается у женщин в возрасте от 50 до 54 лет, тогда как гиперплазия с атипией наиболее распространена в возрастной группе 60–64 года, при этом у женщин в возрасте до 30 лет заболевание регистрируется довольно редко [5, 6]. Согласно литературным данным ГЭ (особенно с элементами атипии) является предрасполагающим фактором возникновения рака эндометрия, причем повышенный риск злокачественного перерождения наблюдается у женщин с гиперпластическими процессами эндометрия в возрасте ≤ 39 и ≥ 50 лет [7]. Имеются литературные данные, что около 40% женщин молодого возраста, имеющих ГЭ, подвергаются оперативному вмешательству, что в результате может обуславливать различные нарушения репродукции [8].

Среди факторов риска ГЭ значимая роль отводится эстроген-прогестероновому дисбалансу, раннему менархе и поздней менопаузе, инсулинорезистентности, воспалению, наличию коморбидных заболеваний (ожирение, сахарный диабет, гипертоническая болезнь, доброкачественные заболевания органов малого таза), генетическим факторам и др. [1, 3, 4, 6, 7, 9–11]. Важно отметить, что несмотря на очевидную значимость наследственных факторов в формировании ГЭ [1], количество генетических исследований данного заболевания не только в нашей стране, но во всем мире весьма ограничено [2, 3, 12], эти работы фрагментарны, а полученные результаты неоднозначны, что определяет актуальность продолжения молекулярно-генетических исследований ГЭ.

Цель данного исследования – оценить ассоциативные связи однонуклеотидного полиморфизма гена *LHCGR* с ГЭ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на выборке 520 больных ГЭ и 981 женщине группы контроля, сформированных в БОКБ (отделение гинекологии) под контролем комиссии по этике НИУ БелГУ. Диагностика ГЭ

проводилась сертифицированными врачами-гинекологами (выполнялась гистероскопия с получением биоптата эндометрия и его последующим морфологическим исследованием). Наличие простой ГЭ без атипии являлось основанием для включения в группу больных. В группу контроля включались женщины без клинических и УЗИ-признаков ГЭ (обследовались при профилактических осмотрах) [2]. Возрастные характеристики больных и контроля были сопоставимы (41.78 и 40.73 лет соответственно, $p > 0.05$). В группу исследования были включены русские женщины, родившиеся и проживающие в Центральном Черноземье РФ [13, 14], предварительно давшие согласие на участие в исследовании.

Для генетического исследования была использована ДНК, выделенная из образцов крови общепринятым (фенольно/хлороформным) методом [15]. Для генотипирования были отобраны четыре полиморфных варианта гена *LHCGR* (rs4953616, rs4374421, rs6729809, rs7579411), являющиеся регуляторными [16, 17]: согласно биоинформатической базы данных HaploReg [18] эти локусы характеризуются значимым регуляторным потенциалом. Генотипирование исследуемых полиморфных локусов было выполнено ПЦР (метод TaqMan зондов) [19].

Для сравнительной оценки частот аллелей и генотипов между пациентами с ГЭ и контрольной группой использовался критерий χ^2 (применялась поправка Йетса на непрерывность) [20]. Расчеты проводились в программном обеспечении “STATISTICA” с использованием таблиц сопряженности 2×2 . Для оценки ассоциативных связей однонуклеотидного полиморфизма (и том числе их гаплотипов) с ГЭ были использованы общепринятые в генетико-эпидемиологических исследованиях показатели OR (отношение шансов) и 95%CI (95%-ный доверительный интервал для OR) [21]. Значения OR и 95%CI были получены методом логистической регрессии [22], имплементированным в программе gPLINK [23]. При проведении расчетов использовались три генетические модели (аддитивная, рецессивная, доминантная) [24, 25]. Неравновесие по сцеплению между анализируемыми вариантами гена *LHCGR* было оценено на основе коэффициентов D' Левонтина и корреляции r^2 Пирсона. Выделение блочной структуры осуществлялось с применением “Confidence intervals” при заданном уровне $r^2 > 0.2$ и $D' > 0.8$ в программе gPLINK. Коррекция на множественные сравнения проводилась пермутационными процедурами [26] с вычислением показателя p_{perm} (значение $p_{perm} < 0.05$ было принято за статистически значимое [27]).

Для оценки функциональных эффектов полиморфных вариантов гена *LHCGR*, ассоциированного с ГЭ, использовались общедоступные биоинформатические ресурсы [28, 29]: HaploReg

(изучались эпигенетические эффекты) [18] и GTExportal (исследовалась связь с транскрипцией генов) [28], и применялись ранее опубликованные методики [2, 30, 31].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выявлено соответствие HWE по всем рассматриваемым локусам гена *LHCGR* как у больных ГЭ, так и в контроле (данные представлены в табл. 1); использовалась поправка Бонферрони на число анализируемых локусов $p_{bonf} > 0.0125$ ($0.05/4$).

Полученные в работе данные (табл. 1) указывают на связь rs7579411 гена *LHCGR* с ГЭ. Генотип C/C rs7579411 имеет “рисковое” значение для ГЭ (OR = 1.26, 95%CI = 1.00–1.59, $p = 0.05$). Согласно данным регрессионного анализа минорный аллель T rs7579411 проявляет протективный эффект при формировании заболевания в рамках доминантной генетической модели (OR = 0.79, 95%CI = 0.63–0.99, $p = 0.05$, $p_{perm} = 0.05$). Достоверных различий в частотах встречаемости гаплотипов в рамках выявленного гаплоглоба rs757941/rs6729809/rs4953616 (параметры выделения гаплоглоба – $r^2 > 0.2$, $D' > 0.8$) у больных ГЭ и в контроле не обнаружено (табл. 2).

По данным биоинформатического ресурса HaploReg установлена локализация rs7579411 гена *LHCGR* в области ДНК, связанной с гистоновыми белками (H3K4me1), маркирующими регуляторные последовательности генома (энхансеры) в культуре клеток-предшественников нейронов, клеток-производных адипоцитов, первичных клеток остеобластов, а также в ДНК-регионе, взаимодействующем с белками-гистонами типа H3K27ac, маркирующими функционально активные энхансерные участки в культивируемой культуре клеток мезодермы.

При *in silico*-оценке связи варианта rs7579411 с уровнем транскрипционной активности генов в организме, проведенной с использованием биоинформатического ресурса GTExportal, установлена ассоциация этого однонуклеотидного полиморфизма с экспрессией гена *STON1-GTF2AIL* (Gene ID: 286749) в щитовидной железе ($p = 0.0000031$, $FDR \leq 0.05$). При этом аллель T данного варианта (в сравнении с альтернативным для него вариантом C) определяет более низкие значения уровня экспрессионной активности гена *STON1-GTF2AIL*, о чем свидетельствует отрицательное значение показателя регрессии для этого аллеля ($\beta = -0.25$). Вместе с этим, согласно данным, представленным в HaploReg, rs7579411 гена *LHCGR* связан с транскрипционной активностью гена *STON1-GTF2AIL* в периферической крови ($p = 0.00064$).

Итак, полученные в настоящей работе данные о функциональных эффектах полиморфного ло-

Таблица 1. Сравнительный анализ частот аллелей и генотипов полиморфных локусов гена *LHCGR* у больных гиперплазией эндометрия и в контрольной группе

Локусы	Аллели, генотипы	Больные (<i>n</i> = 520) абс. (%)	Контроль (<i>n</i> = 981) абс. (%)	OR (95%CI)	<i>p</i>
rs 4374421	T	677 (69.79%)	1300 (68.71%)	1.05 (0.88–1.24)	0.58
	C	293 (30.21%)	592 (31.29%)	0.95 (0.80–1.13)	
	T/T	244 (50.31%)	441 (46.62%)	1.16 (0.93–1.45)	0.20
	T/C	189 (38.97%)	418 (44.19%)	0.80 (0.64–1.01)	0.07
	C/C	52 (10.72%)	87 (9.19%)	1.18 (0.81–1.73)	0.41
	H_o/H_e (P_{HWE})	0.390/0.422 (0.106)	0.442/0.430 (0.449)		
	T/T vs. T/C vs. C/C (аддитивная модель)			0.95 (0.80–1.12)	0.55
	T/T vs. T/C + C/C (доминантная модель)			0.86 (0.69–1.07)	0.18
	T/T + T/C vs. C/C (рецессивная модель)			1.19 (0.82–1.70)	0.36
rs7579411	C	587 (57.44%)	1071 (54.98%)	1.10 (0.94–1.29)	0.21
	T	435 (42.56%)	877 (45.02%)	0.90 (0.77–1.06)	
	C/C	175 (34.25%)	285 (29.26%)	1.26 (1.00–1.59)	0.05
	C/T	237 (46.38%)	501 (51.44%)	0.82 (0.65–1.02)	0.07
	T/T	99 (19.37%)	188 (19.30%)	1.00 (0.76–1.33)	1.00
	H_o/H_e (P_{HWE})	0.464/0.489 (0.241)	0.514/0.495 (0.244)		
	C/C vs. C/T vs. T/T (аддитивная модель)			0.90 (0.77–1.05)	0.19
	C/C vs. C/T + T/T (доминантная модель)			0.79 (0.63–0.99)	0.05
	C/C + C/T vs. T/T (рецессивная модель)			1.00 (0.77–1.32)	0.97
rs6729809	T	713 (69.22%)	1264 (67.67%)	1.07 (0.91–1.27)	0.41
	C	317 (30.78%)	604 (32.33%)	0.93 (0.78–1.10)	
	T/T	247 (47.96%)	419 (44.86%)	1.13 (0.91–1.41)	0.28
	T/C	219 (42.52%)	426 (45.61%)	0.88 (0.70–1.10)	0.29
	C/C	49 (9.52%)	89 (9.53%)	0.99 (0.68–1.46)	1.00
	H_o/H_e (P_{HWE})	0.425/0.426 (1.000)	0.456/0.438 (0.205)		
	T/T vs. T/C vs. C/C (аддитивная модель)			0.93 (0.78–1.09)	0.38
	T/T vs. T/C + C/C (доминантная модель)			0.88 (0.71–1.09)	0.26
	T/T + T/C vs. C/C (рецессивная модель)			0.99 (0.69–1.43)	0.99
rs 4953616	T	742 (72.46%)	1408 (72.06%)	1.02 (0.86–1.21)	0.85
	C	282 (27.54%)	546 (27.94%)	0.98 (0.82–1.16)	
	T/T	267 (52.15%)	493 (50.46%)	1.07 (0.86–1.33)	0.57
	T/C	208 (40.63%)	422 (43.19%)	0.90 (0.72–1.12)	0.37
	C/C	37 (7.22%)	62 (6.35%)	1.15 (0.74–1.79)	0.59
	H_o/H_e (P_{HWE})	0.406/0.399 (0.740)	0.432/0.403 (0.026)		
	T/T vs. T/C vs. C/C (аддитивная модель)			0.98 (0.82–1.16)	0.81
	T/T vs. T/C + C/C (доминантная модель)			0.93 (0.75–1.16)	0.54
	T/T + T/C vs. C/C (рецессивная модель)			1.21 (0.75–1.75)	0.51

Примечание. OR – показатель отношения шансов, *p* – уровень значимости, H_o – наблюдаемая гетерозиготность, H_e – ожидаемая гетерозиготность, P_{HWE} – уровень значимости отклонения от закона Харди–Вайнберга.

Таблица 2. Распределение гаплотипов полиморфных локусов rs757941–rs6729809–rs4953616 гена *LHCGR* среди больных гиперплазией эндометрия и в контрольной группе

Гаплотип	Частота гаплотипа		OR	<i>p</i>
	больные	контроль		
TCC	0.270	0.277	0.94	0.705
TCT	0.036	0.044	0.86	0.288
TTT	0.127	0.131	0.98	0.773
CTT	0.567	0.549	1.05	0.338

Примечание. Результаты получены методом логистической регрессии, OR – отношение шансов, *p* – уровень значимости.

куса rs7579411 гена *LHCGR*, определяющего подверженность к гиперплазии эндометрия, указывают на его важное эпигенетическое значение (связан с регуляторными последовательностями ДНК-энхансерами) и влияние на экспрессию гена *STON1-GTF2AIL* в щитовидной железе и периферической крови (“протективный” для ГЭ аллель *T* rs7579411 определяет низкий уровень транскрипции).

Согласно информации генетической базы данных GeneCards [32] ген *LHCGR* является белок-кодирующим и контролирует синтез рецепторов к лютеинизирующему гормону (ЛГ)/хорионическому гонадотропину (ХГ). Следует отметить, что ЛГ является одним из “ключевых” гормонов женского организма, контролирующих “работу” ее репродуктивной системы. Посредством взаимодействия с этими рецепторами ЛГ влияет на образование эстрогенов/андрогенов в фолликулах яичников, является индуктором овуляции, вовлечен в формирование желтого тела вследствие лютеинизации клеток гранулезы, влияет на синтез желтым телом прогестерона, а также других стероидных гормонов [33]. Данные ЛГ-опосредованные процессы в системе “гипоталамус-гипофиз-яичники” женщины имеют важное патофизиологическое значение при возникновении ГЭ, т.к. одним из ключевых моментов в формировании заболевания является гиперэстрогения (абсолютная или относительная) при недостатке прогестерона [1, 3, 4].

По данным GeneCards [32], результатом экспрессии участка ДНК в регионе гена *LHCGR* является образование транскрипта *STON1-GTF2AIL*. Особенностью данного транскрипта является то, что он включает в себя элементы полинуклеотидных цепей, транскрибируемых с двух генов – *STON1* и *GTF2AIL*, и может подвергаться в дальнейшем альтернативному сплайсингу. Продуктом гена *GTF2AIL* является одна из субъединиц основного фактора транскрипции TFIIA (является “ключевым” фактором регуляции транскрипционной активности подавляющего числа генов). Ген *STON1* контролирует синтез белка стонина 1, который задействован в механизмах “местной” кле-

точной подвижности, адгезии и эндоцитоза [32]. В ряде ранее проведенных работ продемонстрирована связь rs7579411 *LHCGR* (в составе эпистатических взаимодействий) с возрастом появления первых месячных (возраст менархе) и ростом женщин [16], риском развития генитального эндометриоза [9]. При этом обращает на себя внимание факт того, что (согласно литературным данным [34]) аллель *T* ассоциирован с поздним менархе ($\beta = 0.058$), а согласно нашим данным этот аллельный вариант имеет протективное значение для гиперплазии эндометрия, что полностью согласуется между собой. Также литературные данные указывают на связь однонуклеотидного полиморфизма генов *LHCGR* и *STON1-GTF2AIL* с поликистозом яичников [35, 36]. Обнаружена более высокая экспрессия данных генов в подкожной жировой ткани у женщин с поликистозом яичников [37] и межэтнические различия в транскрипционной активности *STON1-GTF2AIL* у белокожих/чернокожих женщин в возрастной группе 35 лет и старше, имеющих миому матки [38].

В работе продемонстрирована ассоциация с ГЭ полиморфного варианта rs7579411 гена *LHCGR*. Генотип *C/C* имеет рисковое значение для ГЭ, тогда как аллельный вариант *T* служит “защитным” фактором при возникновении заболевания. Однонуклеотидный полиморфизм rs7579411 *LHCGR* обладает значимыми эпигенетическими эффектами (находится в ДНК-регионе, маркирующем регуляторные последовательности) и связан с экспрессией гена *STON1-GTF2AIL* в органах и тканях (щитовидная железа, периферическая кровь), вовлеченных в патофизиологию заболевания. При этом аллель *T* ассоциирован с низкой транскрипционной активностью гена *STON1-GTF2AIL*.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для молодых докторов наук (проект “Изучение генетических факторов репродуктивного здоровья женщин” (МД-3284.2022.1.4)).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национально-го комитета по исследовательской этике и Хель-

синкской 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. *Sanderson P.A., Critchley H.O.D., Williams A.R.W. et al.* New concepts for an old problem: the diagnosis of endometrial hyperplasia // *Hum. Reprod. Update.* 2017. V. 23(2). P. 232–254.
2. *Ponomarenko I., Reshetnikov E., Polonikov A. et al.* Candidate genes for age at menarche are associated with endometrial hyperplasia // *Gene.* 2020. V. 757. P. 144933. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144933>
3. *Chandra V., Kim J.J., Benbrook D.M. et al.* Therapeutic options for management of endometrial hyperplasia // *J. Gynecol. Oncol.* 2016. V. 27(1). P. e8. <https://doi.org/10.3802/jgo.2016.27.e8>
4. *Burke T.W., Tortolero-Luna G., Malpica A. et al.* Endometrial hyperplasia and endometrial cancer // *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* 1996. V. 23(2). P. 411–456.
5. *Reed S.D., Newton K.M., Clinton W.L. et al.* Incidence of endometrial hyperplasia // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2009. V. 200(6). P. 678. e1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2009.02.032>
6. *Rodriguez A.M., Polychronopoulou E., Hsu E. et al.* Factors associated with endometrial cancer and hyperplasia among middle-aged and older Hispanics // *Gynecol. Oncol.* 2021. V. 160(1). P. 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2020.10.033>
7. *Jeong J.Y., Hwang S.O., Lee B. et al.* Risk factors of progression to endometrial cancer in women with endometrial hyperplasia: A retrospective cohort study // *PLoS One.* 2020. V. 15(12). P. e0243064. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243064>
8. *Kadirogullari P., Atalay C.R., Ozdemir O., Sari M.E.* Prevalence of co-existing endometrial carcinoma in patients with preoperative diagnosis of endometrial hyperplasia // *J. Clin. Diagn. Res.* 2015. V. 9(10). P. QC10–QC14.
9. *Ponomarenko I., Reshetnikov E., Polonikov A. et al.* Candidate genes for age at menarche are associated with endometriosis // *Reprod. Biomed. Online.* 2020. V. 41(5). P. 943–956. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.04.016>
10. *Ponomarenko I., Reshetnikov E., Polonikov A. et al.* Candidate genes for age at menarche are associated with uterine leiomyoma // *Front. Genet.* 2021. V. 11. P. 512940. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.512940>
11. *Alsudairi H.N., Alrasheed A.T., Dvornyk V.* Estrogens and uterine fibroids: an integrated view // *Research Results in Biomedicine.* 2021. V. 7. № 2. P. 156–163. <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2021-7-2-0-6>
12. *Demakova N.A.* Molecular and genetic characteristics of patients with hyperplasia and endometrial polyps // *Research Results in Biomedicine.* 2018. V. 4. № 2. P. 26–39. <https://doi.org/10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-4>
13. *Litovkina O., Nekipelova E., Dvornyk V. et al.* Genes involved in the regulation of vascular homeostasis determine renal survival rate in patients with chronic glomerulonephritis // *Gene.* 2014. V. 546(1). P. 112–116. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.04.020>
14. *Reshetnikov E.A., Akulova L.Y., Dobrodomova I.S. et al.* The insertion-deletion polymorphism of the ACE gene is associated with increased blood pressure in women at the end of pregnancy // *J. Renin. Angiotensin Aldosterone Syst.* 2015. V. 16(3). P. 623–32. <https://doi.org/10.1177/1470320313501217>
15. *Tikunova E., Ovtcharova V., Reshetnikov E. et al.* Genes of tumor necrosis factors and their receptors and the primary open angle glaucoma in the population of Central Russia // *Int. J. Ophthalmol.* 2017. V. 10. P. 1490–1494. <https://doi.org/10.18240/ijo.2017.10.02>
16. *Ponomarenko I., Reshetnikov E., Altuchova O. et al.* Association of genetic polymorphisms with age at menarche in Russian women // *Gene.* 2019. V. 686. P. 228–236. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.11.042>
17. *Starikova D., Ponomarenko I., Reshetnikov E. et al.* Novel data about association of the functionally significant polymorphisms of the MMP-9 gene with exfoliation glaucoma in the Caucasian population of Central Russia // *Ophthalmic Res.* 2021. V. 64(3). P. 458–464. <https://doi.org/10.1159/000512507>
18. *Ward L.D., Kellis M.* HaploReg v4: Systematic mining of putative causal variants, cell types, regulators and target genes for human complex traits and disease // *Nucl. Ac. Res.* 2016. V. D1. P. D877–D881.
19. *Reshetnikov E., Zarudskaya O., Polonikov A. et al.* Genetic markers for inherited thrombophilia are associated with fetal growth retardation in the population of Central Russia // *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2017. V. 43(7). P. 1139–1144. <https://doi.org/10.1111/jog.13329>
20. *Moskalenko M.I., Milanova S.N., Ponomarenko I.V. et al.* Study of associations of polymorphism of matrix metalloproteinases genes with the development of arterial hypertension in men // *Kardiologiya.* 2019. V. 59(7S). P. 31–39. <https://doi.org/10.18087/cardio.2598>
21. *Reshetnikov E., Ponomarenko I., Golovchenko O. et al.* The VNTR polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene and blood pressure in women at the end of pregnancy // *Taiwan J. Obstet. Gynecol.* 2019. V. 58(3). P. 390–395. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2018.11.035>
22. *Eliseeva N., Ponomarenko I., Reshetnikov E. et al.* The haplotype of the CDKN2B-AS1 gene is associated with primary open-angle glaucoma and pseudoexfoliation glaucoma in the Caucasian population of Central Russia // *Ophthalmic Genet.* 2021. V. 42(6). P. 698–705. <https://doi.org/10.1080/13816810.2021.1955275>
23. *Purcell S., Neale B., Todd-Brown K. et al.* PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses // *Am. J. Hum. Genet.* 2007. V. 81(3). P. 559–575. <https://doi.org/10.1086/519795>

24. *Minyaylo O., Ponomarenko I., Reshetnikov E. et al.* Functionally significant polymorphisms of the MMP-9 gene are associated with peptic ulcer disease in the Caucasian population of Central Russia // *Sci. Rep.* 2021. V. 11(1). P. 13515. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92527-y>
25. *Eliseeva N., Ponomarenko I., Reshetnikov E. et al.* *LOXLI* gene polymorphism candidates for exfoliation glaucoma are also associated with a risk for primary open-angle glaucoma in a Caucasian population from central Russia // *Mol. Vis.* 2021. V. 27. P. 262–269.
26. *Che R., Jack J.R., Motsinger-Reif A.A., Brown C.C.* An adaptive permutation approach for genome-wide association study: Evaluation and recommendations for use // *BioData Min.* 2014. V. 7. P. 9. <https://doi.org/10.1186/1756-0381-7-9>
27. *Moskalenko M., Ponomarenko I., Reshetnikov E. et al.* Polymorphisms of the matrix metalloproteinase genes are associated with essential hypertension in a Caucasian population of Central Russia // *Sci. Rep.* 2021. V. 11(1). P. 5224. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84645-4>
28. *GTE Consortium.* The GTEx Consortium atlas of genetic regulatory effects across human tissues // *Science.* 2020. V. 369(6509). P. 1318–1330. <https://doi.org/10.1126/science.aaz1776>
29. *Dvornyk V., Ponomarenko I., Belyaeva T. et al.* Filaggrin gene polymorphisms are associated with atopic dermatitis in women but not in men in the Caucasian population of Central Russia // *PLoS One.* 2021. V. 16(12). P. e0261026. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261026>
30. *Golovchenko O., Abramova M., Ponomarenko I. et al.* Functionally significant polymorphisms of *ESR1* and *PGR* and risk of intrauterine growth restriction in population of Central Russia // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2020. V. 253. P. 52–57. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2020.07.045>
31. *Dvornyk V., Ponomarenko I., Minyaylo O. et al.* Association of the functionally significant polymorphisms of the MMP9 gene with *H. pylori*-positive gastric ulcer in the Caucasian population of Central Russia // *PLoS One.* 2021. V. 16(9). P. e0257060. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257060>
32. <http://www.genecards.org/>
33. *Plant T.M.* The hypothalamo-pituitary-gonadal axis // *J. Endocrinology.* 2015. V. 226(2). P. T41–T54. <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0113>
34. *He C., Kraft P., Buring J.E. et al.* A large-scale candidate-gene association study of age at menarche and age at natural menopause // *Hum. Genet.* 2010. V. 128. P. 515–527.
35. *Chen Z.J., Zhao H., He L. et al.* Genome-wide association study identifies susceptibility loci for polycystic ovary syndrome on chromosome 2p16.3, 2p21 and 9q33.3 // *Nat. Genet.* 2011. V. 43(1). P. 55–59.
36. *Shi Y., Zhao H., Shi Y. et al.* Genome-wide association study identifies eight new risk loci for polycystic ovary syndrome // *Nat. Genet.* 2012. V. 44(9). P. 1020–1025.
37. *Jones M.R., Brower M.A., Xu N. et al.* Systems genetics reveals the functional context of PCOS loci and identifies genetic and molecular mechanisms of disease heterogeneity // *PLoS Genet.* 2015. V. 11(8). P. e1005455.
38. *Davis B.J., Risinger J.I., Chandramouli G.V.R. et al.* Gene expression in uterine leiomyoma from tumors likely to be growing (from black women over 35) and tumors likely to be non-growing (from white women over 35) // *PLoS One.* 2013. V. 8(6). P. e63909.

The Polymorphism rs7579411 of the *LHCGR* Gene Is Associated with the Development of Endometrial Hyperplasia

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

^a*Belgorod State University, Belgorod, 308015 Russia*

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

The associations of single nucleotide polymorphisms of the *LHCGR* gene with the formation of endometrial hyperplasia in the Russian population were studied. Genotyping of four loci of the *LHCGR* gene (rs4953616, rs4374421, rs6729809, rs7579411) was performed in 520 patients with endometrial hyperplasia (EH) and 981 women of the control group. A significant contribution to the susceptibility to endometrial hyperplasia of the rs7579411 polymorphism of the *LHCGR* gene has been established. The genotype *C/C* rs7579411 of the *LHCGR* gene is risky for EH (OR = 1.26, $p = 0.05$), whereas the allelic variant *T* rs7579411 of the *LHCGR* gene is a protective factor for EH (OR = 0.79, $p_{perm} = 0.05$). The rs7579411 locus of the *LHCGR* gene has significant epigenetic effects (located in DNA regions marking regulatory sequences (enhancers)) and is associated with the expression of the *STON1-GTF2AIL* gene in organs and tissues (thyroid gland, peripheral blood) involved in the pathophysiology of the disease. At the same time, the allele *T* rs7579411 of the *LHCGR* gene is associated with low transcriptional activity of the *STON1-GTF2AIL* gene ($\beta = -0.25$).

Keywords: endometrial hyperplasia, *LHCGR*, polymorphism, associations.

УДК 575.162:575.167:57.02:57.042

ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ ВАРИАЦИИ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР У ЗДОРОВЫХ ИНДИВИДОВ: ЭФФЕКТ ПОЛИМОРФНОГО ВАРИАНТА ГЕНА *TERT* И УРБАНИЗАЦИИ

© 2022 г. А. В. Казанцева^{1, 2, 3, *}, Ю. Д. Давыдова^{1, 2}, Р. Ф. Еникеева^{1, 2}, Р. Н. Мустафин⁴,
М. М. Лобаскова⁵, С. Б. Малых^{5, 6}, Э. К. Хуснутдинова^{1, 2, 6}

¹Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение
Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия

²Башкирский государственный университет, Уфа, 450076 Россия

³Уфимский государственный нефтяной технический университет, Уфа, 450064 Россия

⁴Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, 450008 Россия

⁵Психологический институт Российской академии образования, Москва, 125009 Россия

⁶Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

*e-mail: Kazantsa@mail.ru

Поступила в редакцию 11.01.2022 г.

После доработки 17.03.2022 г.

Принята к публикации 04.04.2022 г.

Изменение длины теломерных повторов вследствие так называемой “проблемы концевой недорепликации” в существующей литературе связывают с развитием депрессивных расстройств. Однако использование длины теломерных повторов в качестве биомаркера депрессивности является неоднозначным, что связано с влиянием различных средовых факторов как на психоэмоциональное состояние, так и на изменение длины теломер. С целью выявления возможности использования относительной длины теломерных повторов (ОДТП) в лейкоцитах периферической крови в качестве биомаркера повышенной депрессивности до клинических форм расстройства, а также для определения зависимости между длиной теломер, социально-демографическими факторами, генетическими вариантами генов, регулирующих процессы элонгации теломерных концов, и уровнем депрессивности был проведен анализ ассоциаций локусов генов обратной транскриптазы (*TERT* rs7726159), теломеразного РНК-компонента (*TERC* rs1317082) и белка CST-комплекса (*OBFC1* rs2487999) с ОДТП и уровнем депрессивности у здоровых индивидов ($N = 1065$) без психических нарушений в возрасте 18–25 лет. Наряду с генетическими вариантами анализируемые регрессионные модели включали различные социально-демографические параметры в качестве предикторов. В результате статистической обработки результатов было показано отсутствие связи ОДТП с индивидуальными вариациями в уровне депрессивности в изученной выборке. Тем не менее множественный регрессионный анализ позволил сконструировать статистически значимую модель межиндивидуальных вариаций ОДТП ($P = 4.3e-4$; $r^2 = 0.018$), которая включала полиморфный вариант rs7726159 гена *TERT* ($P = 0.020$; $\beta = 0.078$), возраст ($P = 0.001$; $\beta = -0.027$) и место воспитания индивида (городская/сельская местность) ($P = 0.048$; $\beta = 0.063$). Полученные данные подтверждают вовлеченность варианта гена *TERT* и возраста в регуляцию длины теломер в выборке здоровых индивидов 18–25 лет, а также указывают на негативный эффект проживания в условиях урбанизации на укорочение длины теломер, что отражает уровень клеточного старения организма.

Ключевые слова: теломеры, теломераза, теломеразный РНК-компонент, стресс, депрессия, урбанизация, SNP.

DOI: 10.31857/S0016675822090107

Теломеры (теломерные повторы) представляют собой гетерохроматиновые структуры, расположенные на концах хромосом, необходимые для поддержания их целостности и стабильности [1]. Известно, что теломеры состоят из tandemных повторов 5'-TTAGGG-3' протяженностью 10–15 тпн у человека, которые неизбежно сокращаются со

скоростью от 50 до 200 пн в ходе каждого цикла репликации вследствие так называемой “проблемы концевой недорепликации”, а также действия специфических нуклеаз [2]. Тем не менее эта проблема решается в клетках с помощью компенсирующего действия теломеразы — рибонуклеиновой обратной транскриптазы. В состав теломеразы вхо-

дят два основных компонента — обратная транскриптаза (кодируется геном *TERT*, 5p15.33) и теломеразный РНК-компонент (кодируется геном *TERC*, 3q26.2), содержащий матричный участок для синтеза теломерных повторов [3]. В здоровом организме человека теломераза обладает высокой активностью в зародышевых и стволовых клетках и проявляет умеренную активность в лейкоцитах [3]. С другой стороны, длина теломерных повторов регулируется действием шелтериновых и CST-комплексов [4]. CST-комплекс у высших эукариот состоит из белков Stn1 (кодируется геном *OBFC1*), Ten1 и CTC1 и участвует в ингибировании теломераз-зависимого удлинения теломерных повторов [4].

Близнецовые исследования указывают на наследуемость длины теломер ~36%, в то время как средовые влияния определяют ~49% изменений в их длине в ходе онтогенеза [5]. К настоящему времени проведены полногеномные анализы ассоциаций (GWAS), идентифицировавшие полиморфные локусы в генах *TERC*, *TERT* и *OBFC1*, ассоциация которых с длиной теломер была реплицирована [6, 7]. Функциональная значимость была показана для локусов *TERT* rs7726159, *TERC* rs1317082, *OBFC1* rs2487999, ассоциированных с длиной теломер [7].

Изменение длины теломерных повторов, измеряемой в абсолютных или относительных единицах, в существующей литературе связывают с развитием онкологических заболеваний [7], сердечно-сосудистой патологии [8], а также ряда психических расстройств, включая посттравматическое стрессовое расстройство [3], депрессию [9], болезнь Альцгеймера [10]. Предполагается, что один из возможных молекулярных механизмов, лежащих в основе развития психических расстройств, связан с влиянием более короткой длины теломер на функционирование иммунных клеток в нервной системе или в системном кровотоке, что усиливает воспалительные процессы в ЦНС [10].

Согласно литературным данным, определение относительной длины теломер в легкодоступных образцах, таких как периферическая кровь, может давать надежные данные для установления относительной длины теломер в других тканях, включая нейрональные [11]. Возможность использования относительной длины теломерных повторов (ОДТП) в лейкоцитах периферической крови в качестве биомаркера депрессивных расстройств является неоднозначной: некоторые исследования сообщают об укорочении теломер у пациентов с депрессией по сравнению с контрольной группой [1, 9], в то время как в других работах подобной связи не наблюдалось [12].

Наряду с традиционным подходом использование биоинформатических пайплайнов для оценки

длины теломер по данным полногеномного секвенирования (TelSeq) позволило выявить, что укорочение теломер при депрессивных расстройствах связано с наличием неблагоприятных условий среды [1]. Известно, что неблагоприятные стрессовые воздействия в раннем возрасте оказывают плейотропный поведенческий, физиологический и эпигенетический эффект на различные системы организма [13] вследствие изменения ответа гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой (ГГН) системы на стресс, что в дальнейшем может приводить к нарушению психического здоровья [14, 15]. Среди средовых факторов, влияющих на длину теломерных повторов, сообщается о возраст-зависимом снижении ОДТП [8], особенностях детско-родительских отношений [16], неблагоприятных травмирующих событиях в детстве [15], стрессовых воздействиях [17] и влиянии окружающей обстановки [18] и уровня доходов семьи [19]. Стоит отметить, что мужчины по сравнению с женщинами и индивиды европейского происхождения по сравнению с лицами других рас характеризуются более короткой длиной теломер [19]. Накопление активных форм кислорода и свободных радикалов в клетках, зависящее от возраста и связанное с действием стрессовых факторов, воспалительных реакций и неправильного образа жизни (табакокурения, избыточного приема алкоголя, низкой физической активности) приводит к укорочению теломер [2, 18]. Учитывая возможный эффект вышеуказанных средовых факторов на психоэмоциональное состояние [20, 21] и клеточное старение организма, изучение большого массива социально-демографических характеристик в контексте влияния на длину теломер представляется актуальным.

Таким образом, в настоящей работе было предположено, что относительная длина теломерных повторов может выступать в качестве биомаркера, отражающего действие негативных средовых факторов на предыдущих этапах онтогенеза человека и/или индивидуальную стрессовую чувствительность, которые, в свою очередь, могут определять манифестацию депрессивности. Альтернативная гипотеза состояла в том, что длина теломер зависит от индивидуальной стрессовой чувствительности и психоэмоционального состояния наряду с определенными средовыми факторами и генетическими вариантами, ассоциированными с работой теломеразы и CST-комплекса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 1065 здоровых индивидов без нарушений психоэмоциональной сферы (79% женщин) — студенты ВУЗов Республики Башкортостан и Удмуртской Республики (ср. возраст 20.99 ± 3.32 лет), из них русских — 357, татар — 340, удмуртов — 234, индивидов смешанной

этнической принадлежности — 134. Включенные в исследование индивиды не состояли на учете у психиатра и нарколога и не имелиотягощенной наследственности по психическим заболеваниям. Участники исследования прошли психологическое тестирование для оценки уровня депрессивности с помощью валидированной для российской популяции методики — шкале депрессии Бека (Beck Depression Inventory, BDI). Все испытуемые также были проанкетированы для получения информации об этнической принадлежности до трех поколений, особенностях воспитания и детско-родительских отношений: эпизодах плохого обращения в детстве, воспитания в полной/неполной семье, материальном положении семьи, возрасте матери при рождении ребенка, месте воспитания — городская/сельская местность, числе детей в семье, возрасте матери ребенка и весе ребенка при рождении (вес менее 2500 г считался низким). Место воспитания (городская/сельская местность) определялось на основании численности населенного пункта: к сельской местности были отнесены демографические единицы численностью менее 50000 человек [21]. На основании опроса была сформирована база данных, содержащая информацию о порядке рождения и количестве детей в семье, стиле родительского воспитания (согласно опроснику Parental Bonding Inventory), а также о воспитании в билингвальной семье для лиц татарской и удмуртской этнических принадлежностей. От всех участников было получено добровольное согласие на участие в исследовании. Данное исследование было одобрено биоэтическим комитетом ИБГ УФИЦ РАН.

Сбор биологического материала (периферической крови) осуществлялся в 2017–2019 гг. с последующим выделением ДНК методом фенольно-хлороформной экстракции. Генотипирование полиморфных вариантов генов *TERT* rs7726159, *TERC* rs1317082, *OBFC1* rs2487999 проводили с помощью технологии конкурентной аллель-специфичной ПЦР (KASP™, LGC Genomics, UK) на амплификаторе “CFX96” (BioRad, США) с проведением анализа флуоресценции по конечной точке. Результаты оценки распределения частот аллелей и генотипов изученных полиморфных локусов соответствовали распределению Харди–Вайнберга: $P = 0.84$ для rs7726159 (*TERT*), $P = 0.63$ для rs1317082 (*TERC*), $P = 0.56$ для rs2487999 (*OBFC1*). Для оценки относительной длины теломерных повторов ДНК анализируемых образцов была выравнена до концентрации 20 нг/мкл для дальнейшего анализа согласно работе [22]. Детекция синтезируемого продукта проводилась при помощи интеркалирующего флуоресцентного красителя IQ SYBR Green Supermix (BioRad). Для проведения ПЦР в режиме реального времени (“CFX96”, BioRad) использовались пары праймеров для амплификации теломерных повторов (Т) и однокопийного

гена бета-глобина (*HGB*), выбранного в качестве консервативного гена (S) [23]. При проведении ПЦР в реальном времени оценивался пороговый цикл (C_t) при амплификации фрагмента консервативного гена (S) и фрагмента ДНК, включающего теломерные повторы. Поскольку каждый образец (и экспериментальный, и стандартный) ставился в трех технических повторах, для дальнейшего анализа вычислялось среднее значение порогового цикла для каждого образца. В случае различий в численном выражении значения C_t между повторами более чем на 30% образец исключался. В качестве контрольного образца использовалась смесь ДНК нескольких индивидов (пул ДНК), идентичная в каждом запуске реакции. Воспроизводимость результатов составила более 98%.

Для определения относительного числа теломерных повторов использовалась широко применяемая методика [22], основанная на формуле $2^{-\Delta\Delta C_t}$. С этой целью вычислялись разница пороговых циклов для теломерного и контрольного ПЦР и относительное количество теломерных повторов в геноме (Т/S) по формуле $T/S = 2^{-\Delta\Delta C_t}$, где $\Delta\Delta C_t = (C_{tT}(\text{образца}) - C_{tT}(\text{пулаДНК})) - (C_{tS}(\text{образца}) - C_{tS}(\text{пулаДНК}))$. По данным литературы относительное количество теломерных повторов в геноме (Т/S) пропорционально $2^{-\Delta\Delta C_t}$ и длине теломер в анализируемом образце.

Для изучения связи между длиной теломерных повторов и фенотипическими вариациями уровня депрессивности был проведен корреляционный анализ с использованием коэффициента корреляции Спирмена и множественный линейный регрессионный анализ (RStudio v4.1.2). В качестве зависимой переменной были использованы показатель депрессивности (в баллах) или длина теломерных повторов, а в качестве независимой переменной — ОДТП (или уровень депрессивности соответственно) наряду с полиморфными локусами в генах *TERT*, *TERC*, *OBFC1* и средовыми факторами. С целью выявления модели с наибольшей предиктивной значимостью был использован алгоритм поочередного исключения независимых переменных из модели, включающей все независимые предикторы (backward elimination) до достижения наилучших показателей процента вариации (r^2), уровня значимости (p -value) и критерия Акаике. Уровень статистической значимости принимался равным $P = 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В рамках настоящего исследования был проведен корреляционный и линейный регрессионный анализ между уровнем депрессивности и относительной длиной теломерных повторов в лейкоцитах периферической крови у индивидов 18–25 лет, в

Таблица 1. Средние значения (стандартное отклонение) показателей относительной длины теломерных повторов в изученных группах в зависимости от генотипов полиморфных вариантов генов *TERT* rs7726159, *TERC* rs1317082, *OBFC1* rs2487999

Вариант гена	Группа	Общая выборка (N = 1065)	Женщины (N = 841)	Мужчины (N = 224)	Русские (N = 357)	Татары (N = 340)	Удмурты (N = 234)
<i>TERT</i> rs7726159	C/C	0.94 ± 0.46 ^a	0.94 ± 0.45 ^b	0.97 ± 0.47	0.96 ± 0.44	0.89 ± 0.47 ^c	0.98 ± 0.40
	A/C	1.03 ± 0.50	1.05 ± 0.52	0.93 ± 0.40	1.02 ± 0.52	1.01 ± 0.47	1.12 ± 0.54
	A/A	1.00 ± 0.44	1.02 ± 0.42	0.90 ± 0.52	0.89 ± 0.40	1.03 ± 0.51	1.12 ± 0.41
<i>TERC</i> rs1317082	A/A	0.99 ± 0.46	1.00 ± 0.46	0.93 ± 0.45	0.99 ± 0.48	0.94 ± 0.42	1.08 ± 0.44
	A/G	0.99 ± 0.48	0.99 ± 0.48	0.98 ± 0.45	0.98 ± 0.48	0.98 ± 0.52	1.06 ± 0.41
	G/G	0.96 ± 0.54	0.99 ± 0.57	0.86 ± 0.41	0.99 ± 0.45	0.94 ± 0.47	1.01 ± 0.66
<i>OBFC1</i> rs2487999	C/C	1.00 ± 0.48	1.01 ± 0.49	0.93 ± 0.43	0.99 ± 0.48	0.97 ± 0.48	1.07 ± 0.47
	C/T + T/T	0.96 ± 0.45	0.94 ± 0.44	1.02 ± 0.53	0.97 ± 0.44	0.90 ± 0.45	0.99 ± 0.45

Примечание. Статистически значимые различия между группами (тест Краскела–Уоллиса): ^a $\chi^2 = 7.03$, $P = 0.030$; ^b $\chi^2 = 9.22$, $P = 0.010$; ^c $\chi^2 = 7.48$, $P = 0.024$.

результате которого было установлено отсутствие корреляции ($P = 0.465$; $r = -0.023$) и ассоциации ($P = 0.155$; $\beta = -0.003$) между этими переменными. Поскольку литературные данные указывают на возможные различия в ОДТП в зависимости от половой и этнической принадлежности, нами была проведена оценка различий в относительной длине теломерных повторов между группами. Статистически значимых различий в показателях ОДТП не было выявлено между мужчинами и женщинами ($P = 0.137$), между индивидами русской и татарской этнических принадлежностей ($P = 0.428$). В то же время были обнаружены статистически значимые различия в показателях ОДТП между индивидами русской и удмуртской этнических принадлежностей ($P = 0.025$), индивидами татарской и удмуртской этнических принадлежностей ($P = 0.005$). В связи с этим дальнейший линейный регрессионный анализ, направленный на выявление вовлеченности полиморфных вариантов генов *TERT* rs7726159, *TERC* rs1317082, *OBFC1* rs2487999 в формирование индивидуальных различий в длине теломер, проводился с включением этнической принадлежности в качестве ковариаты. В результате анализа были подтверждены статистически значимые различия в ОДТП между носителями генотипа rs7726159*A/C в гене *TERT* и мажорного генотипа rs7726159*C/C в аддитивной модели ($P = 0.015$; $\beta = 0.076$; $r^2 = 0.004$) (табл. 1, 2). В частности, укорочение ОДТП было характерно для индивидов, не имеющих в своем генотипе минорного аллеля rs7726159*A (табл. 1, рис. 1, а). Средние значения показателей ОДТП в зависимости от генотипов изученных полиморфных локусов в общей выборке, среди женщин, мужчин, индивидов русской, татарской, удмуртской этнических принадлежностей представлены в табл. 1.

В то же время не было обнаружено ассоциации между полиморфными вариантами генов *TERC* rs1317082 ($P = 0.893$) и *OBFC1* rs2487999 ($P = 0.426$) и ОДТП в изученной выборке. В результате использования алгоритма поочередного исключения независимых переменных нами была выявлена статистически значимая модель межличностных вариаций ОДТП ($P = 5.9e-4$; $r^2 = 0.015$), которая включала возраст ($P = 0.001$; $\beta = -0.027$) и место воспитания индивида ($P = 0.066$; $\beta = 0.059$) (рис. 1, б). При одновременном включении генетических и средовых предикторов наиболее значимой выступала регрессионная модель ($P = 4.3e-4$; $r^2 = 0.018$), состоящая из полиморфного варианта rs7726159 гена *TERT* ($P = 0.019$; $\beta = 0.078$), возраста ($P = 0.001$; $\beta = -0.027$) и места воспитания индивида ($P = 0.048$; $\beta = 0.063$) (табл. 2; рис. 1, в, г).

С целью проверки гипотезы о связи уровня депрессивности с вариациями в длине теломер и изученными генетическими вариантами была проведена серия множественных регрессионных анализов, которые показали отсутствие ассоциации между полиморфными вариантами генов *TERT* rs7726159 ($P = 0.239$), *TERC* rs1317082 ($P = 0.768$), *OBFC1* rs2487999 ($P = 0.110$), ОДТП ($P = 0.195$) (табл. 2) и психоэмоциональными характеристиками у здоровых индивидов без клинической депрессивной симптоматики.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе мы не подтвердили первоначальную гипотезу о связи уровня депрессивности у психически здоровых индивидов с длиной теломер с включением средовых факторов и вариантов генов, регулирующих восстановление числа теломерных повторов, в качестве предикто-

Таблица 2. Множественный регрессионный анализ, выявляющий эффект полиморфных вариантов генов *TERC* rs7726159, *TERC* rs1317082, *OBFC1* rs2487999 и социально-демографических факторов (возраста и места воспитания) на формирование индивидуальных различий в длине теломер и уровне депрессивности

ЗП	Предиктор	Группа	Модель 1		Модель 2		Модель 3		Модель 4	
			β	<i>p</i> -value	β	<i>p</i> -value	β	<i>p</i> -value	β	<i>p</i> -value
ОДТП	Своб. коэф.		0.949	<2e-16	0.990	<2e-16	0.997	<2e-16	0.96	<2e-16
	<i>TERC</i> rs7726159	A/C	0.076	0.015	–	–	–	–	0.075	0.017
		A/A	0.044	0.373	–	–	–	–	0.043	0.389
	<i>TERC</i> rs1317082	A/G	–	–	0.003	0.917	–	–	–0.001	0.961
		G/G	–	–	–0.019	0.687	–	–	–0.022	0.649
	<i>OBFC1</i> rs2487999	C/T	–	–	–	–	–0.042	0.302	–0.038	0.347
		T/T	–	–	–	–	–0.163	0.404	–0.167	0.392
	<i>p</i> -value модели		0.052		0.893		0.426		0.265	
	Скорр. r^2		3.8e-3		<2e-16		<2e-16		1.6e-3	
	Своб. коэф.		1.53	<2e-16	1.483	<2e-16	0.918	<2e-16	1.478	<2e-16
ОДТП	<i>TERC</i> rs7726159	A/C	–	–	0.074	0.020	0.080	0.017	0.078	0.019
		A/A	–	–	0.039	0.439	0.064	0.239	0.051	0.348
	Возраст		–0.027	1e-3	–0.026	0.001	–	–	–0.027	0.001
	Место воспитания		0.059	0.066	–	–	0.069	0.032	0.063	0.048
	<i>p</i> -value модели		5.9e-4		9.2e-4		0.019		4.3e-4	
	Скорр. r^2		0.015		0.013		0.008		0.018	
	Своб. коэф.		9.261	<2e-16	9.120	<2e-16	8.867	<2e-16	9.145	<2e-16
	ОДТП		–0.643	0.206	–0.661	0.155	–0.643	0.166	–0.605	0.195
	<i>TERC</i> rs7726159	A/C	–0.601	0.239	–	–	–	–	–0.530	0.263
		A/A	–0.274	0.739	–	–	–	–	–0.176	0.814
Депрессивность	<i>TERC</i> rs1317082	A/G	–	–	–0.139	0.768	–	–	–0.073	0.877
		G/G	–	–	–0.216	0.769	–	–	–0.149	0.840
	<i>OBFC1</i> rs2487999	C/T	–	–	–	–	0.961	0.110	0.931	0.123
		T/T	–	–	–	–	–1.664	0.568	–1.605	0.583
	<i>p</i> -value модели		0.356		0.542		0.174		0.505	
	Скорр. r^2		2.7e-4		<2e-16		0.002		<2e-16	

Примечание. ЗП – зависимая переменная; ОДТП – относительная длина теломерных повторов; своб. коэф. – свободный коэффициент в регрессионной модели; скорр. r^2 – скорректированный коэффициент детерминации; β – коэффициент регрессии. Референсными группами в моделях являлись: для *TERC* rs7726159, *TERC* rs1317082, *OBFC1* rs2487999 – минорные генотипы; для места воспитания – городская местность. Статистически значимые различия выделены полужирным шрифтом.

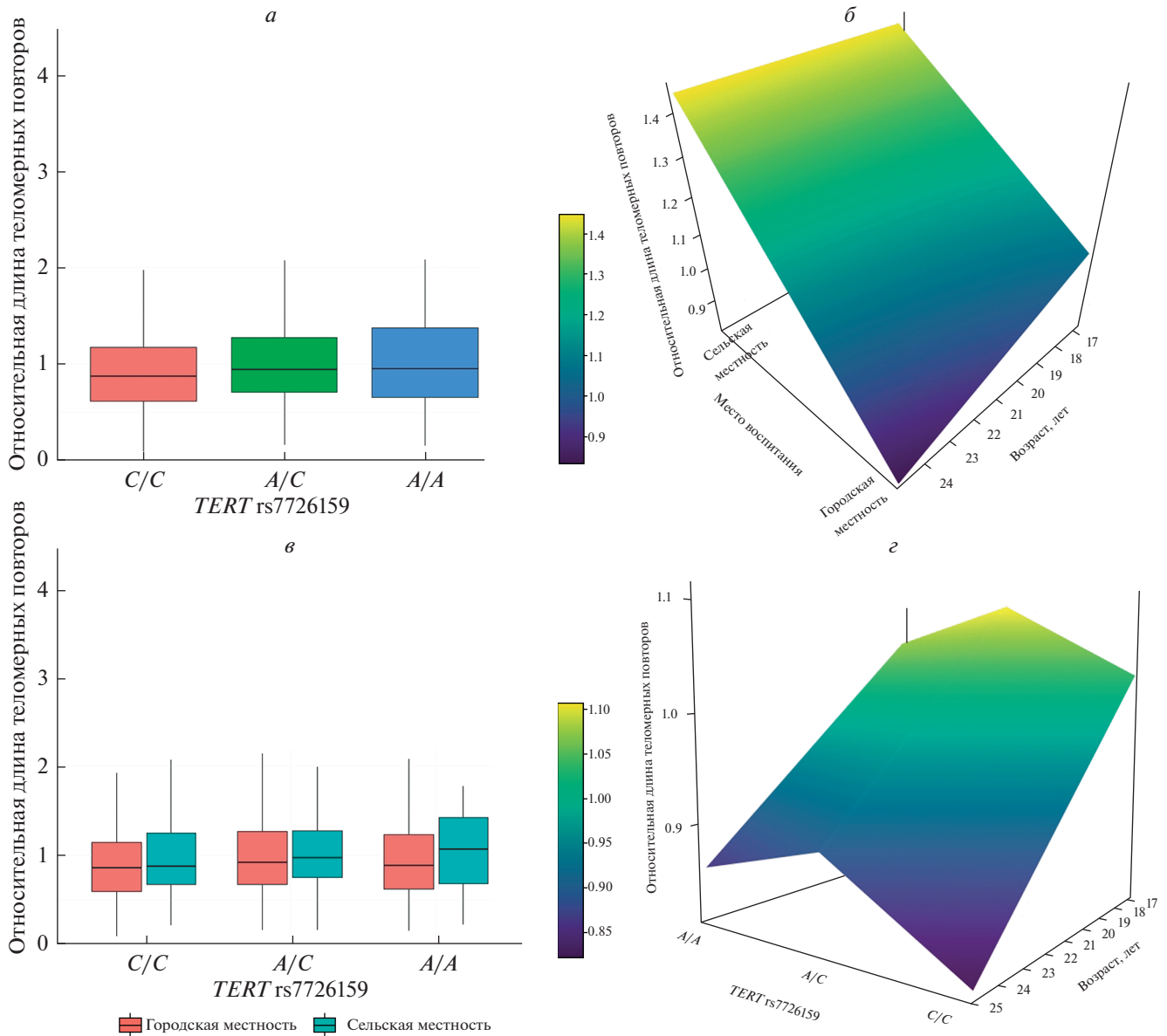


Рис. 1. Зависимость относительной длины теломерных повторов от аллельных вариантов локуса rs7726159 в гене *TERT* (а), возраста и места воспитания (городской/сельской местности) (б), указанных генетических и средовых предикторов одновременно (в, г).

ров. Тем не менее в рамках данного исследования было продемонстрировано, что место воспитания (городская/сельская местность), возраст, а также число минорных аллелей полиморфного локуса rs7726159 в гене *TERT* являются предикторами индивидуальных различий в длине теломер. Результаты опубликованного GWAS-исследования согласуются с полученными нами данными, указывая на ассоциацию минорного аллеля полиморфного варианта rs7726159 в гене *TERT* с увеличением длины теломер [7]. Несмотря на то что в литературе сообщается о связи укорочения теломер с наличием минорного аллеля локуса *TERC*

rs1317082 и их увеличения — с наличием минорного аллеля локуса rs2487999 в гене *OBFC1* [7], в нашей работе такого рода ассоциаций выявлено не было. Несмотря на выдвинутую нами гипотезу о связи длины теломер с манифестацией депрессивности и опубликованные данные о вовлеченности локусов в генах *TERT* и *TERC* в формирование интернализированных проблем (депрессии, тревожности и посттравматического стрессового расстройства) [3, 24], мы не смогли подтвердить наличие ассоциации этих генетических вариантов с уровнем депрессивности у психически здоровых индивидов.

Согласно результатам опубликованных работ все три изученных нами полиморфных локуса (*TERT* rs7726159, *TERC* rs1317082, *OBFC1* rs2487999) были идентифицированы в GWAS-исследованиях длины теломер [6, 7]. Наши данные указывают на вовлеченность лишь полиморфного варианта rs7726159 в гене *TERT* (как в рамках основного эффекта, так и ген-средовых взаимодействий) в формирование индивидуальных различий в длине теломер у психически здоровых индивидов возраста ранней зрелости. В частности, носители гетерозиготного генотипа rs7726159*A/C характеризовались увеличением ОДТП по сравнению с носителями мажорного генотипа rs7726159*C/C. Ранее с использованием большой выборки ($N = 66\,363$) индивидов из датской популяции было показано статистически значимое укорочение длины теломер у носителей аллеля rs7726159*C в гене *TERT* [10], что согласуется с результатами настоящего исследования, также выявившими наименьшую ОДТП у индивидов с генотипом rs7726159*C/C по сравнению с носителями минорного аллеля A.

В ряде опубликованных работ, одновременно учитывающих как роль факторов, отражающих средовое воздействие в детском возрасте, так и длину теломерных повторов на развитие депрессии в послеродовой период, сообщается, как и в нашей работе, об отсутствии связи между уровнем депрессивности и вариациями в длине теломер [15]. В то же время негативные средовые воздействия в детском возрасте играют важную роль в изменении длины теломер и модификациях профиля метилирования ДНК, указывая на увеличение аллостатической нагрузки множества систем организма [15]. Авторы другой работы, оценивавшей возможную вовлеченность уровня депрессивности в изменение длины теломер в рамках крупномасштабного исследования депрессии и тревожности (Netherlands Study of Depression and Anxiety), аналогично нашим результатам показали отсутствие модифицирующего эффекта негативного психоэмоционального состояния на число теломерных повторов, хотя и обнаружили влияние неблагоприятной окружающей среды на снижение их числа [18]. Необходимо отметить, что постоянно повышенный уровень стресса способствует значительному укорочению хромосомных теломер в лонгитюдной парадигме, причем показана гендерная специфичность в восприятии стрессовых факторов различной природы [17].

Влияние возраста на длину теломер обсуждается в литературе достаточно давно [2, 18]. Известно, что со временем длина теломер в нормальных клетках уменьшается до тех пор, пока они не становятся слишком короткими, чтобы выполнять свою роль и сохранять свою способность к делению. Это приводит к клеточному старению, которое является одной из основных причин

старения всего организма. По результатам нашего исследования даже в пределах небольшого возрастного периода (18–25 лет) был выявлен значимый негативный эффект возраста на укорочение длины теломер.

Наряду с влиянием возраста в настоящем исследовании был выявлен негативный эффект урбанизации на укорочение длины теломер совместно с основным эффектом генетического варианта rs7726159 в гене *TERT*. Отрицательный эффект проживания в городской местности в детском возрасте обусловлен тем, что этот период онтогенетического развития является наиболее чувствительным к негативному воздействию неблагоприятных факторов среды, что связано с анатомо-физиологическими особенностями детского организма: низкой эффективностью барьерных факторов верхних дыхательных путей, повышенной проницаемостью гематоэнцефалического барьера, слизистых оболочек, ограниченной экскреторной функцией почек, увеличением в процессе роста массы жировой и костной ткани, и способствует депонированию токсичных веществ. В то же время незрелость ферментных систем определяет снижение эффективности факторов местного иммунитета, антиоксидантной защиты, системы детоксикации химических соединений [25]. Ранее нашей научной группой также был продемонстрирован неблагоприятный эффект воспитания в условиях урбанизации на когнитивные способности человека в контексте ген-средовых взаимодействий, который был значимым даже в случае генетически “благоприятного” аллеля в гене аполипопротеина E (*ApoE*) [26]. Большое количество опубликованных работ указывает на статистически значимое влияние неблагоприятной окружающей обстановки на укорочение теломер, которое, по данным одной из работ [18], соответствует снижению хронологического возраста на 8.7–11.9 лет в числовом эквиваленте (или 69–174 пн) при ухудшении окружающих условий. Негативное влияние проживания в высокотехнологичном обществе по сравнению с малыми территориальными единицами, в первую очередь, связано с ежегодным выбросом миллионов тонн токсичных веществ в атмосферу с различных промышленных предприятий и в виде выхлопных газов. Известно, что тяжелые металлы (например, марганец), концентрация которых превышена в городской среде по сравнению с сельской местностью [25], оказывают негативное воздействие на ЦНС, приводя к сенсibilизации организма и развитию нейродегенеративных заболеваний [27]. Исследования, проведенные на модельных животных, демонстрируют влияние сварочного дыма на изменение длины теломер в тканях головного мозга, связанное с регуляцией компонентов шелтеринового комплекса (Trf1 и Trf2) без изменения активности теломераз, с одной стороны, и увеличение

концентрации биомаркеров, ассоциированных с нейродегенеративными изменениями, с другой стороны [27].

По данным крупномасштабного исследования, включавшего информацию по суммарным концентрациям 37 ксенобиотиков, взятых из регистра Национальной оценки воздушных токсикантов США (The National Air Toxics Assessment), превышение содержания некоторых экотоксикантов в атмосфере (бензидаина, 1,4-диоксана, четыреххлористого углерода, хлоропрена, дибромида этилена и дихлорида пропилена) ассоциировано с укорочением теломер вследствие инициирования процессов окислительного стресса в организме [28]. Негативное воздействие урбанизации и связанное с этим загрязнение окружающей среды наблюдается не только на организм человека, но и на другие живые объекты. Например, при изучении связи между концентрацией ряда ксенобиотиков (фталатов, хлорорганических и пиретроидных пестицидов, полихлорбифенилов, полибромдифениловых эфиров, полициклических ароматических углеводородов и их метаболитов) и длиной теломер у европейского голавля (*Squalius cephalus*) была показана отрицательная связь между уровнем метаболитов фталатов и длиной теломерных повторов, а также обитанием в гидрографической сети городских водоемов [29].

Необходимо отметить, что неблагоприятное воздействие загрязнения воздуха оказывает влияние на клеточное старение организма (снижение длины теломер) уже в период пренатального развития [30]. Поскольку проживание в городской/сельской местности в детстве в большей степени коррелирует с местом проживания матери в период гестации, существенный негативный эффект пренатального развития в условиях урбанизации на укорочение длины теломер может быть обусловлен молекулярными событиями, происходящими в плаценте и связанными с наличием токсичных веществ в окружающем воздухе. В частности, мелкодисперсные частицы PM_{2.5} (размером меньше 2.5 мкм) легко проникают через гематоплацентарный барьер и оказывают влияние на развивающийся плод вследствие образования активных форм кислорода и азота. Частицы мелкодисперсной пыли могут иметь свободные радикалы на своей поверхности или образовывать активные гидроксильные радикалы в ходе реакции Фентона в присутствии переходных металлов (например, железа) на поверхности частиц [31]. С другой стороны, генерация активных форм кислорода может быть связана с индукцией твердыми частицами изменений в функционировании NADPH-оксидазы и активации воспалительных клеток [30]. Мелкодисперсный аэрозоль оказывает влияние на будущий организм посредством эпигенетических и генетических изменений. В частности, глобальный уровень метилирования ДНК (мобильных элемен-

тов LINE-1) в плаценте обратно коррелирует с воздействием мелкодисперсных частиц на организм матери и плода [30]. В свою очередь, снижение глобального уровня метилирования ДНК оказывает негативное влияние на длину теломер [32]. В то же время действие частиц PM_{2.5} может изменять экспрессию микроРНК в плацентарной ткани и в определенных отделах развивающегося головного мозга [33], что указывает на важную роль таких модификаций в нейробиологических процессах.

Одним из сопутствующих проявлений проживания в городских условиях является воздействие антропогенного шума на живой организм, которое может быть особенно критичным на ранних этапах развития. Шум может выступать в качестве фактора стрессовой природы, приводя к клеточному старению, что выражается в укорочении длины теломер, например у особой большой синицы (*Parus major*), гнездящихся в условиях городской среды по сравнению с сельской местностью [34]. С другой стороны, ряд авторов также сообщает о связи наличия "озелененной" территории около места проживания и более длинных теломер [35]. Возможно, что проживающие в неблагоприятном окружении индивиды испытывают значительную аллостатическую нагрузку (старение всех систем организма) и хроническую активацию ответа организма на стресс, приводящие к гиперфункционированию ГГН-системы и переизбытку стрессовых гормонов, способствуя укорочению теломер.

На молекулярном уровне вовлеченность средовых факторов в регуляцию длины теломер может быть обусловлена изменениями эпигенетического профиля под их действием. Существует большое количество данных, связывающих уровень метилирования ДНК с негативным воздействием поллютантов (см. обзор [36]). В то же время безопасная окружающая обстановка оказывает благоприятный эффект на увеличение длины теломер в связи с гипометилированием. В частности, занятия медитативными практиками приводят к снижению метилирования короткого плеча хромосомы 4, характеризующегося отсутствием белок-кодирующих генов и соседствующего с инсуляторным регионом [37]. Предполагается, что метилирование ДНК в субтеломерных районах может играть роль в поддержании длины теломер [37]. Например, фермент TET (с англ. ten-eleven translocation, метилцитозиндиоксигеназа), участвующий в конвертации 5-метилцитозина в 5-гидроксиметилцитозин, может быть критичным для поддержания структуры теломер вследствие модулирования метилирования ДНК в субтеломерных районах [38]. Важная роль метилирования ДНК в гомеостазе теломер подтверждается результатами исследований, проведенных на модельных животных, в которых показано снижение глобального уровня метилирования субтеломерных регионов, сопутствующее чрезмерному удлинению

теломер в эмбриональных стволовых клетках мыши с “выключенными” ДНК-метилтрансферазами [39]. Кроме того, предполагается, что средовые воздействия на эпигеном обусловлены чувствительными к стрессу транспозонами, запускающими процесс образования некодирующих РНК, способных влиять на модификации гистонов и метилирование определенных генетических локусов [40].

Таким образом, в результате настоящего исследования впервые был проанализирован большой объем данных, включающий информацию об относительной длине теломерных повторов, вариантах генов, белковые продукты которых участвуют в регуляции длины теломер, а также социально-демографических параметрах, у психически здоровых индивидов 18–25 лет. Нами была подтверждена вовлеченность генетического варианта rs7726159 гена обратной транскриптазы (*TERT*) и возраста в регуляцию длины теломер в изученной когорте. Кроме того, был выявлен негативный эффект проживания в условиях урбанизации в детском возрасте на укорочение длины теломер, характеризующей уровень клеточного старения организма. Несмотря на выдвинутую гипотезу о связи уровня депрессивности (вне клинических форм) со снижением длины теломер, в настоящей работе не удалось обнаружить такой закономерности у лиц в период ранней взрослости. Настоящее исследование характеризуется рядом преимуществ, включая большой объем выборки одной возрастной группы, собранной до пандемии COVID-19, что позволяет оценить психоэмоциональное состояние еще до действия вируса SARS-CoV-2, негативно влияющего на психическое здоровье человека. Другим преимуществом работы является попытка связать особенности воспитания в детском возрасте с изменениями в длине теломер впоследствии. Тем не менее нами не были учтены другие важные компоненты генной сети, участвующие в регуляции длины теломер, и неблагоприятные стрессовые воздействия в раннем возрасте, которые также способствуют укорочению хромосомных теломер.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 17-78-30028) (проведение психологического тестирования и сбор биологических образцов), мега-гранта Правительства Республики Башкортостан (генотипирование) и мега-гранта Правительства РФ (проект № 075-15-2021-595) (статистическая обработка и биоинформатический анализ данных).

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. *Cai N., Chang S., Li Y. et al.* Molecular signatures of major depression // *Curr. Biol.* 2015. V. 25. № 9. P. 1146–1156. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.03.008>
2. *Portillo A.M., Peláez C.* Mathematical modelling of ageing acceleration of the human follicle due to oxidative stress and other factors // *Math. Med. Biol.* 2021. V. 38. № 3. P. 273–291. <https://doi.org/10.1093/imammb/dqab00>
3. *Avetyan D., Zakharyan R., Petrek M., Arakelyan A.* Telomere shortening in blood leukocytes of patients with posttraumatic stress disorder // *J. Psychiatr. Res.* 2019. V. 111. P. 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2019.01.018>
4. *Aramburu T., Plucinsky S., Skordalakes E.* POT1-TPP1 telomere length regulation and disease // *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2020. V. 18. P. 1939–1946. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.06.040>
5. *Andrew T., Aviv A., Falchi M. et al.* Mapping genetic loci that determine leukocyte telomere length in a large sample of unselected female sibling pairs // *Am. J. Hum. Genet.* 2006. V. 78. № 3. P. 480–486. <https://doi.org/10.1086/500052>
6. *Codd V., Nelson C.P., Albrecht E. et al.* Identification of seven loci affecting mean telomere length and their association with disease // *Nat. Genet.* 2013. V. 45. № 4. P. 422–427, 427e1–2. <https://doi.org/10.1038/ng.2528>
7. *Pooley K.A., Bojesen S.E., Weischer M. et al.* A genome-wide association scan (GWAS) for mean telomere length within the COGS project: identified loci show little association with hormone-related cancer risk // *Hum. Mol. Genet.* 2013. V. 22. № 24. P. 5056–5064. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt355>
8. *Li Y., Cheang I., Zhang Z. et al.* Prognostic association of TERC, TERT gene polymorphism, and leukocyte telomere length in acute heart failure: a prospective study // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2021. V. 12. P. 650922. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.650922>
9. *Michalek J.E., Kepa A., Vincent J. et al.* Genetic predisposition to advanced biological ageing increases risk for childhood-onset recurrent major depressive disorder in a large UK sample // *J. Affect. Disord.* 2017. V. 213. P. 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2017.01.017>
10. *Scheller Madrid A., Rasmussen K.L., Rode L. et al.* Observational and genetic studies of short telomeres and Alzheimer’s disease in 67,000 and 152,000 individuals: a Mendelian randomization study // *Eur. J. Epidemiol.* 2020. V. 35. № 2. P. 147–156. <https://doi.org/10.1007/s10654-019-00563-w>

11. Friedrich U., Griese E., Schwab M. et al. Telomere length in different tissues of elderly patients // *Mech. Ageing Dev.* 2000. V. 119. № 3. P. 89–99. [https://doi.org/10.1016/s0047-6374\(00\)00173-1](https://doi.org/10.1016/s0047-6374(00)00173-1)
12. Verhoeven J.E., Penninx B.W.J.H., Milanesechi Y. Unraveling the association between depression and telomere length using genomics // *Psychoneuroendocrinology.* 2019. V. 102. P. 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.11.029>
13. Боринская С.А., Рубанович А.В., Ларин А.К. и др. Полногеномное исследование связи метилирования CpG-сайтов с агрессивным поведением // *Генетика.* 2021. Т. 57. № 12. С. 1450–1457. <https://doi.org/10.31857/S0016675821120043>
14. Davydova Yu.D., Enikeeva R.F., Kazantseva A.V. et al. Genetic basis of depressive disorders // *Vavilov J. Genetics and Breeding.* 2019. V. 23. № 4. P. 465–472. <https://doi.org/10.18699/VJ19.515>
15. Robakis T.K., Zhang S., Rasgon N.L. et al. Epigenetic signatures of attachment insecurity and childhood adversity provide evidence for role transition in the pathogenesis of perinatal depression // *Transl. Psychiatry.* 2020. V. 10(1). P. 48. <https://doi.org/10.1038/s41398-020-0703-3>
16. Chen X., Zeng C., Gong C. et al. Associations between early life parent-child separation and shortened telomere length and psychopathological outcomes during adolescence // *Psychoneuroendocrinology.* 2019. V. 103. P. 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2019.01.021>
17. Meier H.C.S., Hussein M., Needham B. et al. Cellular response to chronic psychosocial stress: Ten-year longitudinal changes in telomere length in the multi-ethnic study of atherosclerosis // *Psychoneuroendocrinology.* 2019. V. 107. P. 70–81. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2019.04.018>
18. Park M., Verhoeven J.E., Cuijpers P. et al. Where you live may make you old: the association between perceived poor neighborhood quality and leukocyte telomere length // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 6. P. e0128460. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128460>
19. Starkweather A.R., Alhaeri A.A., Montpetit A. et al. An integrative review of factors associated with telomere length and implications for biobehavioral research // *Nursing Research.* 2014. V. 63. № 1. P. 36–50. <https://doi.org/10.1097/NNR.0000000000000009>
20. Davydova Yu.D., Kazantseva A.V., Enikeeva R.F. et al. The role of oxytocin receptor (OXTR) gene polymorphisms in the development of aggressive behavior in healthy individuals // *Rus. J. Genet.* 2020. V. 56. № 9. P. 1129–1138. <https://doi.org/10.1134/S1022795420090057>
21. Kazantseva A.V., Davydova Yu.D., Enikeeva R.F. et al. AVPR1A main effect and OXTR-by-environment interplay in individual differences in depression level // *Heliyon.* 2020. V. 6. № 10. P. e05240. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05240>
22. Cawthon R.M. Telomere measurement by quantitative PCR // *Nucl. Acids Res.* 2002. V. 30. № 10. P. e47. <https://doi.org/10.1093/nar/30.10.e47>
23. O'Callaghan N.J., Fenech M. A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length // *Biol. Proced. Online.* 2011. V. 13. P. 3. <https://doi.org/10.1186/1480-9222-13-3>
24. Kalungi A., Kinyanda E., Womersley J.S. et al. TERT rs2736100 and TERC rs16847897 genotypes moderate the association between internalizing mental disorders and accelerated telomere length attrition among HIV+ children and adolescents in Uganda // *BMC Med. Genomics.* 2021. V. 14. № 1. P. 15. <https://doi.org/10.1186/s12920-020-00857-z>
25. Атуцкова Н.Г. Обоснование гигиенических нормативов содержания марганца и никеля в атмосферном воздухе по результатам количественной оценки риска для здоровья населения: Дис. ... канд. мед. наук. Пермь: ФБНУ “Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения”, 2015. 174 с.
26. Kazantseva A.V., Enikeeva R.F., Davydova Yu.D. et al. The role of the KIBRA and APOE genes in developing spatial abilities in humans // *Vavilov J. Genetics and Breeding.* 2021. V. 25. № 8. P. 839–846. <https://doi.org/10.18699/VJ21.097>
27. Shoeb M., Mustafa G.M., Kodali V.K. et al. A possible relationship between telomere length and markers of neurodegeneration in rat brain after welding fume inhalation exposure // *Environ. Res.* 2020. V. 180. P. 108900. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108900>
28. Niehoff N.M., Gammon M.D., Keil A.P. et al. Hazardous air pollutants and telomere length in the Sister Study // *Environ. Epidemiol.* 2019. V. 3. № 4. P. e053. <https://doi.org/10.1097/ee9.0000000000000053>
29. Molbert N., Angelier F., Alliot F. et al. Fish from urban rivers and with high pollutant levels have shorter telomeres // *Biol. Lett.* 2021. V. 17. № 1. P. 20200819. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2020.0819>
30. Saenen N.D., Martens D.S., Neven K.Y. et al. Air pollution-induced placental alterations: an interplay of oxidative stress, epigenetics, and the aging phenotype? // *Clin. Epigenetics.* 2019. V. 11. № 1. P. 124. <https://doi.org/10.1186/s13148-019-0688-z>
31. Ghio A.J., Carraway M.S., Madden M.C. Composition of air pollution particles and oxidative stress in cells, tissues, and living systems // *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 2012. V. 15. № 1. P. 1–21. <https://doi.org/10.1080/10937404.2012.632359>
32. Dong Y., Huang Y., Gutin B. et al. Associations between Global DNA methylation and telomere length in healthy adolescents // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 4210. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04493-z>
33. Chao M.W., Yang C.H., Lin P.T. et al. Exposure to PM2.5 causes genetic changes in fetal rat cerebral cortex and hippocampus // *Environ. Toxicol.* 2017. V. 32. № 4. P. 1412–1425. <https://doi.org/10.1002/tox.22335>
34. Salmón P., Nilsson J.F., Nord A. et al. Urban environment shortens telomere length in nestling great tits, *Parus major* // *Biol. Lett.* 2016. V. 12. № 6. P. 20160155. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2016.015>
35. Miri M., de Prado-Bert P., Alahabadi A. et al. Association of greenspace exposure with telomere length in preschool children // *Environ. Pollut.* 2020. V. 266 (Pt 1). P. 115228. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115228>

36. Cronjé H.T., Elliott H.R., Nienaber-Rousseau C., Pieters M. Leveraging the urban-rural divide for epigenetic research // *Epigenomics*. 2020. V. 12. № 12. P. 1071–1081. <https://doi.org/10.2217/epi-2020-0049>
37. Mendioroz M., Puebla-Guedea M., Montero-Marín J. et al. Telomere length correlates with subtelomeric DNA methylation in long-term mindfulness practitioners // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. P. 4564. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61241-6>
38. Yang J., Guo R., Wang H. et al. Tet enzymes regulate telomere maintenance and chromosomal stability of mouse ESCs // *Cell Rep.* 2016. V. 15. № 8. P. 1809–1821. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.058>
39. Gonzalo S., Jaco I., Fraga M.F. et al. DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells // *Nat. Cell Biol.* 2006. V. 8. № 4. P. 416–424. <https://doi.org/10.1038/ncb1386>
40. Мустафин Р.Н., Казанцева А.В., Еникеева Р.Ф. и др. Эпигенетика агрессивного поведения // *Генетика*. 2019. Т. 55. № 9. С. 987–997. <https://doi.org/10.1134/S0016675819090091>

Individual Differences in Relative Telomere Length in Mentally Healthy Subjects: The Effect of *TERT* Gene Polymorphism and Urban Residency

A. V. Kazantseva^{a, b, c, *}, Yu. D. Davydova^{a, b}, R. F. Enikeeva^{a, b}, R. N. Mustafin^d,
M. M. Lobaskova^e, S. B. Malykh^{e, f}, and E. K. Khusnutdinova^{a, b, f}

^a*Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*

^b*Bashkir State University, Ufa, 450076 Russia*

^c*Ufa State Petroleum Technical University, Ufa, 450064 Russia*

^d*Bashkir State Medical University, Ufa, 450008 Russia*

^e*Psychological Institute of Russian Academy of Education, Moscow, 125009 Russia*

^f*Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

*e-mail: Kazantsa@mail.ru

The changes in the telomere's length caused by the terminal underreplication in the existing literature are related to depressive disorders. However, the use of telomere length as a biomarker of depressive states is ambiguous, which is due to the effect of various environmental factors on both the psychoemotional state and cellular aging of an organism. In order to identify the possible use of the relative telomere length (RTL) measured in peripheral blood leukocytes as a biomarker of enhanced liability to depression prior the clinical symptoms, as well as to determine the link between telomere length, socio-demographic factors, allelic variants of the genes involved in the regulation of telomere elongation and depression level, the association analysis of reverse transcriptase (*TERT* rs7726159), telomerase RNA component (*TERC* rs1317082), and the CST complex encoding protein (*OBFC1* rs2487999) gene polymorphisms was performed with RTL and depression level in mentally healthy individuals ($N = 1065$) aged 18–25 years. Together with genetic variants, the examined regression models included various socio-demographic parameters as predictors. As a result of statistical analysis, we failed to observe the association between RTL and individual differences in depression level in the studied sample. Nevertheless, multiple regression analysis allowed to construct a statistically significant model of individual variance in RTL ($P = 4.3e-4$; $r^2 = 0.018$), which included rs7726159 in the *TERT* gene ($P = 0.020$; $\beta = 0.0078$) and such environmental predictors as age ($P = 0.0001$; $\beta = -0.027$) and place of residence in childhood (urban/rural area) ($P = 0.048$; $\beta = 0.063$). The data obtained confirm the involvement of *TERT* gene variants and age in telomere length in mentally healthy individuals aged 18–25 years, and indicate a negative effect of urban residency on telomere length shortening, which reflects the cellular aging of an organism.

Keywords: telomeres, telomerase, telomerase RNA component, stress, depression, urban residency, SNP.

АНАЛИЗ МУТАЦИЙ ГЕНА *ATL1* И КЛИНИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ТЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ У ПАЦИЕНТОВ С НАСЛЕДСТВЕННОЙ СПАСТИЧЕСКОЙ ПАРАПЛЕГИЕЙ

© 2022 г. И. М. Хидиятова^{1, 2, 3, *}, Е. В. Сайфуллина⁴, А. С. Карунас^{1, 2, 3},
А. Ф. Ахметгалеева⁴, Р. Ф. Кутлубаева⁴, Л. А. Смакова¹, С. Л. Лобов¹, А. В. Поляков⁵,
О. А. Щагина⁵, В. А. Кадникова⁵, О. П. Рыжкова⁵, Р. В. Магжанов⁴, Э. К. Хуснутдинова^{1, 2, 3}

¹Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра
Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия

²Башкирский государственный университет, Уфа, 450076 Россия

³Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

⁴Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, 450000 Россия

⁵Медико-генетический научный центр, Москва, 115522 Россия

*e-mail: imkhid@mail.ru

Поступила в редакцию 01.02.2022 г.

После доработки 15.03.2022 г.

Принята к публикации 21.03.2022 г.

Наследственные спастические параплегии (НСП) – группа нейродегенеративных болезней с преимущественным поражением пирамидного тракта. Аутосомно-доминантная форма SPG3A, связанная с мутациями в гене *ATL1*, относится к наиболее распространенным в популяциях Европы формам НСП. В 63 неродственных семьях с НСП из Республики Башкортостан (РБ) проведен анализ гена *ATL1*. Идентифицировано два патогенных варианта: у одного пациента – дупликация всего 3-го экзона, у семи больных из трех неродственных семей – миссенс-мутация с.1246C>T (p.Arg416Cys). Частота распространения SPG3A среди неродственных пациентов в РБ составила 6.3%. В одной из обследованных семей установлено происхождение мутации с.1246C>T *de novo*. Клиническая характеристика заболевания в большинстве случаев соответствовала неосложненной НСП, протекающей в легкой форме. Выявлены внутрисемейные различия по клиническим проявлениям заболевания, в том числе у однойяйцевых близнецов. Возраст манифестации у большинства обследованных пациентов составил от 10 до 50 лет.

Ключевые слова: наследственные спастические параплегии, ген *ATL1*, мутации, MLPA, NGS, Республика Башкортостан.

DOI: 10.31857/S0016675822090119

Наследственные спастические параплегии (НСП) – генетически и клинически гетерогенная группа дегенеративных заболеваний нервной системы, обусловленных дистальным поражением длинных аксонов кортикоспинального тракта [1]. Основным клиническим проявлением НСП является спастичность мышц нижних конечностей. Спастические параличи могут сочетаться с различными дополнительными симптомами – атрофией зрительных нервов, глухотой, атаксией, полинейропатией, эпилепсией, нарушением когнитивных функций и др. В зависимости от того, является ли основной симптом единственным или сочетается с другими неврологическими или экстракраневральными симптомами, выделяют неосложненные (“чистые”) или осложненные формы заболевания [2, 3]. Распространенность НСП

в мире варьирует от 1.27 до 9.6 на 100000 населения [1].

Значительная клиническая гетерогенность заболевания связана с разнообразными патогенетическими процессами, возникающими в нейронах: дефектами формирования мембранных органоидов, молекулярного транспорта, нарушением процессов миелинизации, функций митохондрий, за которые ответственны мутации в различных генах. В настоящее время известно более 100 генов, связанных с НСП [http://www.neuromuscular.wustl.edu, октябрь 2021]. По современной номенклатуре, генные локусы и соответствующие формы НСП обозначают аббревиатурой SPG (от англ. Spastik Paraplegia Gene), с порядковыми номерами в хронологической последовательности [1]. Заболевание может наследоваться как по

аутосомно-доминантному, так и по аутосомно-рецессивному и X-сцепленному типам наследования. В популяциях Европы за 40–45% случаев аутосомно-доминантных НСП ответственны мутации в гене спастина (*SPAST*, *SPG4*) [4], за 10% случаев — в гене атластина (*ATL1*, *SPG3A*) [5]. Белковые продукты этих двух генов вовлечены во многие важные жизненные процессы в клетке и, в частности, они совместно координируют морфогенез эндоплазматического ретикулума и динамику микротрубочек, и нарушение этих процессов считается одним из главных предполагаемых механизмов аксональной дегенерации при НСП [6–11].

Генетическая форма *SPG3A*, связанная с мутациями в гене *ATL1*, зарегистрирована во многих популяциях мира и считается третьей по частоте среди аутосомно-доминантных НСП и наиболее распространенной причиной рано начинающейся НСП [5, 12–18]. В гене *ATL1*, локализованном в хромосомной области 14q22.1, на сегодняшний день зарегистрировано более 80 различных мутаций, 69 из которых — миссенс-мутации, гораздо реже встречаются небольшие делеции и инсерции, мутации сайта сплайсинга, а также делеции целых экзонов (HGMD professional 2022.4, <http://www.hgmd.cf.ac.uk>). Однако каких-либо четких клинических особенностей *SPG3A* до сих пор не выявлено, отмечается ее значительная клиническая гетерогенность, в том числе внутрисемейная. Единственным важным ориентиром пока считается ранний возраст манифестации заболевания (<10 лет), но он тоже не является абсолютным показателем, и даже в одной семье при одинаковой мутации в гене *ATL1* могут наблюдаться как ранний, так и значительно более поздний дебют болезни [19]. Для некоторых типов мутаций гена *ATL1*, таких как делеции и инсерции, установление клинико-генетических корреляций пока невозможно в силу редкости таких случаев, и информация о них носит лишь описательный характер. Поэтому накопление данных о различных генетических вариантах НСП, в том числе об *SPG3A*, а также о их распространенности в различных популяциях не теряет своей актуальности. Детальные сведения о разнообразии генных мутаций и их функциональной роли в развитии болезни являются основой для разработки патогенетических методов лечения, а информация о распространенности типов генетически гетерогенных патологий, таких как НСП, о спектре и частоте мутаций в соответствующих генах позволяет разрабатывать наиболее эффективные, оптимальные для отдельных регионов, подходы ДНК-диагностики, в целом улучшая медико-генетическое консультирование в семьях пациентов.

В Республике Башкортостан, одном из многонациональных регионов России, эпидемиологическое и молекулярно-генетическое изучение наследственных спастических параплегий проводится уже в течение нескольких лет. Общая распространенность

этой группы заболеваний в республике составляет 3.5 на 100000 населения [20]. Ранее мы представляли сведения об отдельных случаях генетической формы *SPG4*, обусловленной мутациями в гене *SPAST*, вклад которой в общую структуру заболевания в РБ составил 33.3% [21–23]. В настоящей работе мы приводим результаты исследования гена *ATL1* у пациентов с НСП из нашего региона.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Общая обследуемая выборка пациентов представлена 130 индивидами из 63 неродственных семей, что составляет около 70% всех зарегистрированных в Республике Башкортостан больных НСП. По этнической принадлежности в выборку вошли 27 татарских семей, 14 — русских, 5 — башкирских, по одной семье — чувашской, украинской, марийской, 8 — метисных семей, а также 6 семей с неустановленной этнической принадлежностью. В 39 семьях установлен аутосомно-доминантный тип наследования спастического параплегии, в двух — аутосомно-рецессивный, шесть пациентов имели спорадический характер болезни, а для 16 больных тип наследования точно установить не удалось. Выборка была сформирована на основе данных о больных, состоящих на диспансерном учете в Республиканском медико-генетическом центре (РМГЦ), и материалов ежегодных отчетов неврологической службы РБ за 2000–2018 г., предоставляемых ЦРБ и ЛПУ г. Уфы в распоряжение Медико-информационного аналитического центра МЗ РБ. Больные и их ближайшие родственники были осмотрены сотрудниками кафедры неврологии с курсами нейрохирургии и медицинской генетики Башкирского государственного медицинского университета. Контрольная выборка состояла из здоровых жителей РБ различной этнической принадлежности: русской (50 чел.), татарской (50 чел.), башкирской (50 чел.). ДНК была выделена из крови методом фенольно-хлороформной экстракции [24].

Анализ гена *ATL1* был проведен у всех 63 неродственных пациентов, независимо от того, были ли у них до этого идентифицированы мутации в гене спастина. Поскольку выборка пациентов формировалась и одновременно исследовалась на протяжении нескольких лет, анализ гена *ATL1* у разных пациентов был проведен разными методами: у первых 57 неродственных больных поиск мутаций был проведен методом конформационного полиморфизма однонитовой ДНК (SSCP-анализ) и с целью выявления протяженных делеций или инсерций — методом мультиплексной лигазозависимой амплификации (MLPA-анализ); у шести “новых” пациентов с аутосомно-доминантной НСП с неустановленной генетической причиной заболевания было проведено массовое парал-

тельное секвенирование с использованием таргетной панели, включающее анализ кодирующих последовательностей 63 генов, ответственных за различные типы НСП.

Методом SSCP-анализа исследовались все 14 экзонов с прилегающими интронными областями гена *ATL1*. Амплификацию соответствующих фрагментов ДНК проводили методом ПЦР на амплификаторах T100 Thermal Cycler (Bio Rad, США) и Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, США), с использованием олигонуклеотидных праймеров, представленных в работе [15].

MLPA-анализ гена *ATL1* проводили с использованием набора реактивов MLPA probemix P165, MRC-Holland. Реакции MLPA проводили в соответствии с инструкциями производителя. Электрофорез продуктов ПЦР выполняли с использованием генетического анализатора ABI 3130 (Applied Biosystems). Данные MLPA анализировали в программе Coffalyser.Net. Программа рассчитывает относительную высоту пиков образцов и контролей (соотношение пиков). На гетерозиготную делецию экзона указывает отношение относительной высоты пика между образцом и контролем ниже 0.7, тогда как отношение относительной высоты пика выше 1.3 указывает на дубликацию или умножение экзона.

Таргетное секвенирование экзона проведено на секвенаторе нового поколения Ion S5. Для пробоподготовки использована технология ультрамультиплексной ПЦР, сопряженная с последующим секвенированием (AmpliSeq™). Анализ проведен с использованием кастомной панели “Спаستические параплегии”, включающей кодирующие последовательности генов: *GJC2, AP4B1, AMPD2, IBA57, ALDH18A1, ZFYVE27, NT5C2, ENTPD1, MTPAP, CAPN1, BSCL2, KLC2, KIF5A, C12orf65, MARS, VAMP1, B4GALNT1, SPG20, SACS, ATL1, ZFYVE26, DDHD1, TECPR2, AP4S1, NIPAI, SPG11, SPG21, AP4E1, USP8, SPG7, FA2H, ARL6IP1, KIF1C, AFG3L2, RTN2, PNPLA6, C19orf12, CPT1C, MAG, HSPD1, KIF1A, REEP1, PGAP1, MARS2, SPAST, SLC33A1, TFG, WDR48, CYP2U1, ARS1, ZFR, REEP2, AP5Z1, AP4M1, CYP7B1, KIAA0196, ERLIN2, VPS37A, DDHD2, GBA2, L1CAM, PLP1, SLC16A2*. По данным AmpliSeq™ Coverage Analysis, среднее покрытие панели “Спастические параплегии” составляет 363.1, Uniformity 92.02%. Обработка данных секвенирования проведена с использованием стандартного автоматизированного алгоритма, предлагаемого ThermoFisher Scientific (Torrent Suite™), а также программного обеспечения Gene-Talk.

Для оценки популяционных частот выявленных вариантов использованы выборки проектов “1000 геномов”, ESP6500 и Genome Aggregation Database (gnomAD). Для оценки клинической релевантности выявленных вариантов использованы

база данных OMIM, база данных по патогенным вариантам HGMD® Professional, версия 2020.4.

Для подтверждения выявленной в результате NGS-секвенирования мутации с.1246C>T в гене *ATL1* у пробанда проведено секвенирование 12-го экзона гена методом Сэнгера на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3130 XL (Applied Biosystems). Скрининг на наличие/отсутствие данной мутации у шести членов семьи пробанда (больной сын и пять здоровых родственников), а также у пациентов с НСП из 62 неродственных семей и в популяционных выборках здоровых индивидов проведен методом ПДРФ-анализа с использованием эндонуклеазы *MwoI*.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате SSCP-анализа 14 экзонов гена *ATL1*, проведенного у 57 пациентов с НСП из РБ, не было выявлено вариантов, которые могли бы расцениваться как патогенные или вероятно патогенные.

В результате MLPA-анализа, проведенного у этих же больных, в одном случае у пациентки Г. (33.3) из русской семьи была идентифицирована дубликация третьего экзона (dup 3 ex) гена *ATL1* в гетерозиготном состоянии (рис. 1).

Заболевание в семье пациентки Г. наследуется с доминантным паттерном, однако по объективным причинам у других больных членов семьи ДНК-анализ провести не удалось. Первыми симптомами НСП у пробанда были слабость в ногах, изменение походки. В клинической картине: походка изменена по типу спастико-атактической. Сила мышц ног снижена (проксимально), мышечный тонус повышен, при этом снижена глубокая чувствительность в ногах. Кроме данных симптомов, у пациентки выявляется дисфункция тазовых органов. Все симптомы соответствуют неосложненной форме заболевания. Возраст начала болезни — около 40 лет.

В результате таргетного секвенирования панели генов у пациента К. (51.0) татарской этнической принадлежности с аутосомно-доминантной НСП в 12-м экзоне гена *ATL1* был идентифицирован в гетерозиготном состоянии миссенс-вариант с.1246C>T (p.Arg416Cys), подтвержденный методом секвенирования по Сэнгеру (рис. 2).

Данный нуклеотидный вариант является известной патогенной мутацией, он был описан ранее у пациентов с НСП [25–27]. Эта мутация может быть идентифицирована методом ПДРФ-анализа с использованием эндонуклеаз *NgoMIV, Cac8I, NaeI* и *MwoI*, для которых исчезает существующий в норме сайт рестрикции. Этим методом, с использованием рестриктазы *MwoI* (рис. 3), мы провели поиск мутации с.1246C>T у других членов семьи пробанда, у других неродственных пациентов об-

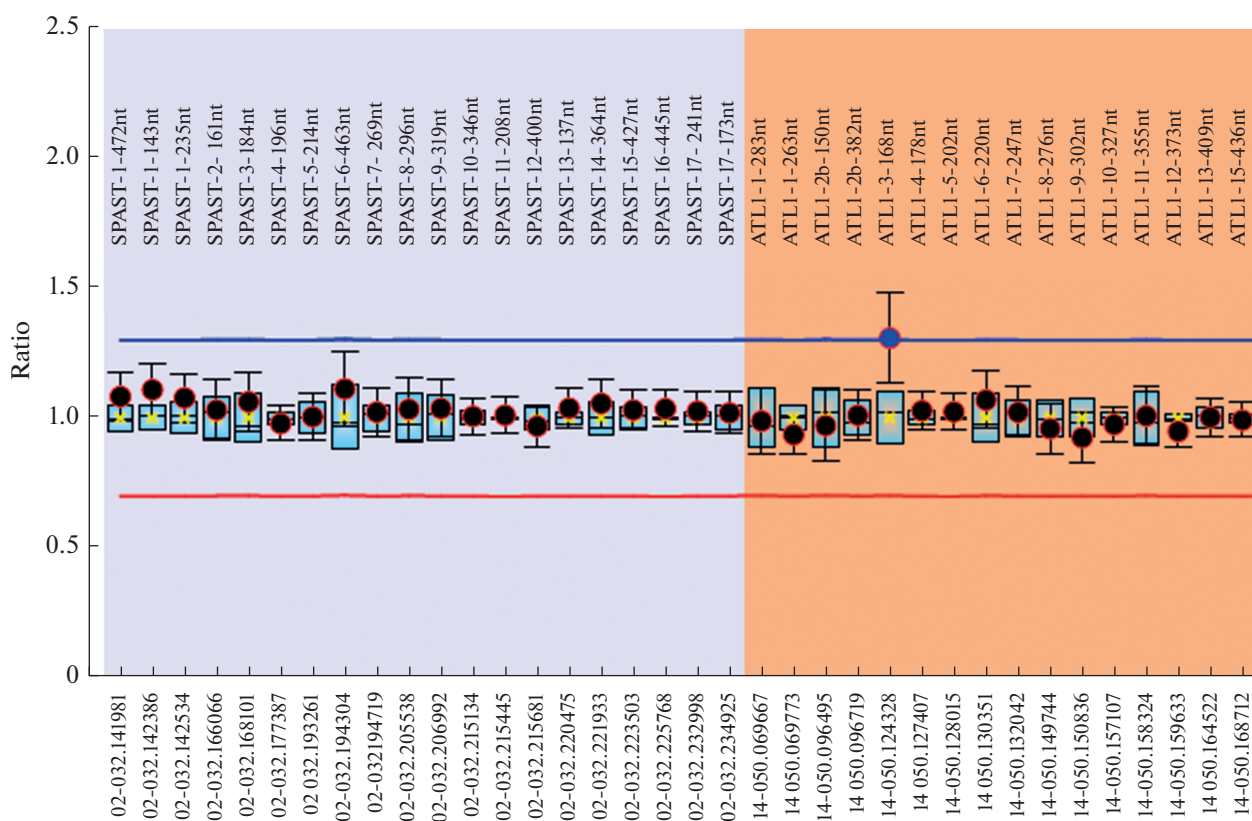


Рис. 1. Результаты MLPA-анализа после обработки в Cofalyser.net: идентификация дупликации третьего экзона гена *ATL1* (зонд ATLL1-3-168nt).

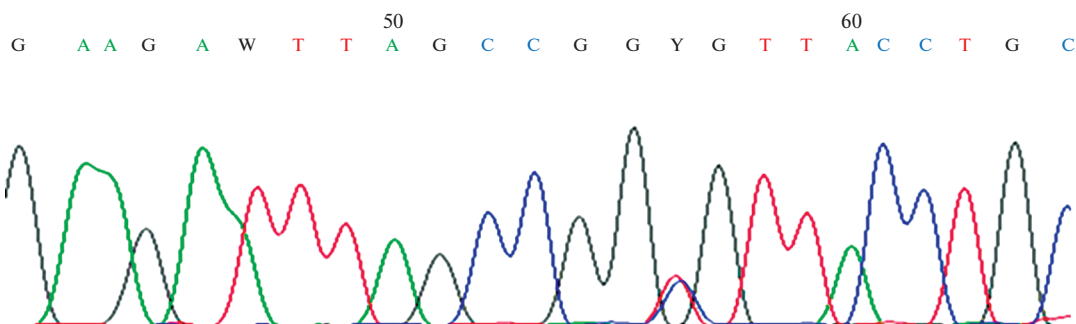


Рис. 2. Секвенирование 12-го экзона гена *ATL1* у пациента с НСП: нуклеотидная замена с.1246C>T в гетерозиготном состоянии.

шей обследуемой выборки, а также в контрольных выборках здоровых индивидов (150 чел.).

В семье пациента К. (51.0) нуклеотидная замена с.1246C>T в гене *ATL1* была выявлена также у его больного сына и не обнаружена у здоровых членов семьи – брата, сестры, дочери, и ни у одного из родителей. На основании отсутствия мутации у родителей было сделано предположение, что у пробанда мутация возникла *de novo*. Проведенный микросателлитный анализ подтвердил кровное родство пробанда с обоими родителями, что подтвердило данное предположение.

В результате скрининга на наличие мутации с.1246C>T у других пациентов из обследуемой выборки она была выявлена еще в двух неродственных семьях – у пациента Л. (16.0) русской этнической принадлежности, у его матери и у его сына, и у двух сестер-близнецов Ч. (41.01 и 41.02) метисного происхождения (мордва/татарка). В контрольных популяционных выборках здоровых индивидов данная мутация не обнаружена.

У всех доступных для исследования пациентов из трех семей с мутацией с.1246C>T проведен анализ клинической картины НСП.

Пробанд 51.0, 1967 г. рождения, с 10–12-летнего возраста отмечал затруднения при быстрой ходьбе и беге, связывал эти жалобы с особенностью строения стоп (“плоские”). В конце второго–начале третьего десятилетия жизни пациента окружающие начали замечать изменение его походки: “шаркает ногами”. Позднее, ближе к 40 годам, сам пациент стал отчетливо ощущать скованность в мышцах ног, приводящую к изменению походки и утомляемости при длительной ходьбе. При объективном осмотре больного выявлено повышение мышечного тонуса, преимущественно в мышцах-сгибателях голени и стоп по спастическому типу до трех баллов по шкале Ашворта, снижение мышечной силы до четырех баллов в проксимальных отделах ног. “Полые” стопы. Сухожильные рефлексы в ногах повышены, отмечаются клонусы обеих стоп и патологические стопные знаки сгибательного и разгибательного типов. Ходит самостоятельно, походка изменена по типу “лыжника”. У сына пробанда, 1990 г. рождения, клинически осмотренного в возрасте 30 лет, отмечаются подобное изменение походки, повышение мышечного тонуса в ногах до одного балла, а также сухожильных рефлексов с ног, клонусы обеих стоп и патологические стопные знаки.

В семье Л. под нашим наблюдением находились пробанд (16.0), его мать и его сын. Первые признаки болезни пробанд отметил в возрасте 20 лет, когда начал замечать изменение походки из-за ощущения скованности в ногах. При осмотре пациента в возрасте 30 лет клиническая симптоматика соответствовала неосложненной спастической параплегии: нижний спастический парез, гиперрефлексия сухожильных рефлексов, положительные стопные и кистевые патологические рефлексы, легкое снижение вибрационной чувствительности в ногах, дисфункция тазовых органов по типу задержки мочеиспускания. У матери пробанда активных жалоб на момент осмотра (в возрасте 56 лет) не было, ее походка была не изменена, но сухожильные рефлексы с ног были повышены и отмечались разгибательные стопные патологические рефлексы. Сын пробанда был осмотрен в возрасте 16 лет, активных жалоб на здоровье не предъявлял, походка была не изменена, мышечный тонус в ногах был удовлетворительным, но отмечалась сухожильная гиперрефлексия с ног. Таким образом, заболевание в семье представлено неосложненной формой с варибельной экспрессивностью.

У однойцевых сестер Ч. (41.01 и 41.02) отмечалась разница как по возрасту манифестации болезни, так и по спектру клинических симптомов. К сожалению, провести осмотр родителей, а также других сибсов и детей сестер не удалось по объективным причинам. У первой сестры изменение походки появилось в возрасте 43–44 лет, клини-

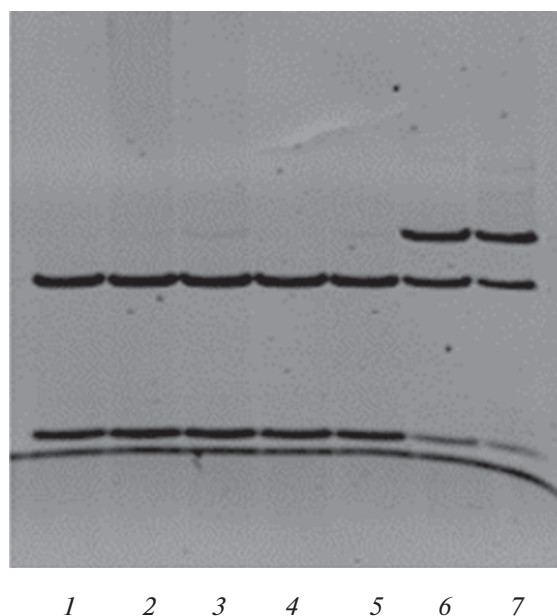


Рис. 3. Образец идентификации мутации с.1246С>Т (р.Arg416Cys) в гене *ATL1* методом ПДРФ-анализа с использованием эндонуклеазы *MwoI* (7%-ный ПААГ): 1–5 – образцы ДНК без мутации; 6, 7 – образцы ДНК с мутацией в гетерозиготном состоянии.

ческая картина в возрасте 46 лет соответствовала неосложненной форме заболевания; у второй сестры жалобы на изменение походки отмечены с возраста 49–50 лет, клиническая симптоматика в возрасте 53 лет включала помимо нижнего спастического пареза легкое снижение вибрационной чувствительности в ногах и снижение когнитивных функций умеренной степени. Электрофизиологические параметры (скорости распространения возбуждения и амплитуды М-ответов по периферическим нервам рук и ног) были в пределах нормальных величин; нейровизуализационные параметры спинного мозга – в норме, а по данным МРТ головного мозга – признаки микроангиопатии и начальные проявления атрофического процесса. Для уточнения связи между снижением когнитивных функций и основным заболеванием требуется продолжение обследования как самой пациентки, так и ее однойцевой сестры.

ОБСУЖДЕНИЕ

В обследуемой нами выборке пациентов с НСП из Республики Башкортостан в четырех из 63 неродственных семей в гене *ATL1* были идентифицированы два различных изменения нуклеотидной последовательности: в одной семье – ранее неопи-санная дупликация 3-го экзона гена, в трех семьях – известная миссенс-мутация с.1246С>Т (р.Arg416Cys). Во всех этих семьях установлен аутосомно-доминантный тип наследования НСП. У пациента с

дупликацией 3-го экзона наблюдалась неосложненная форма заболевания, сопровождающаяся дисфункцией тазовых органов, проявившаяся в возрасте 40 лет. У семи обследованных пациентов из трех семей с мутацией p.Arg416Cys возраст манифестации болезни варьировал от 10 до 50 лет, у большинства из них клиническая картина соответствовала неосложненной форме заболевания, в одном случае — сочетающаяся с дисфункцией тазовых органов; у одной пациентки основные клинические симптомы НСП осложнены когнитивным расстройством умеренной степени. Тяжесть заболевания у большинства из наших пациентов НСП легкая, отмечены и практически бессимптомные случаи (2/7 — 28.6%).

Как уже было сказано, при SPG3A наиболее распространенными мутациями в гене *ATL1* являются миссенс-варианты, тогда как делеции или инсерции встречаются гораздо реже, и в единственном случае описана делеция экзона: Sulek с соавт. [28] методом МЛРА-анализа провели скрининг 93 пациентов на наличие протяженных делеций/дупликаций в генах *SPAST* и *ATL1*, выявив 11 различных делеций и одну дупликацию в гене спастина и делецию 4-го экзона в гене атластин-1. О полной делеции одного аллеля гена *ATL1* в гетерозиготном состоянии, сочетающейся с делецией экзона гена *SPAST*, еще ранее сообщили Beetz et al. [29], в то же время предположив, что у обследованного ими пациента заболевание было обусловлено мутацией гена *SPAST*, а не делецией целого гена *ATL1*. Кодированный геном *ATL1* трансмембранный белок атластин-1 принадлежит подсемейству динаминов больших ГТФаз, имеет N-концевой ГТФ-связывающий домен и два близкорасположенных гидрофобных сегмента на C-конце, которые формируют трансмембранный домен [8, 9]. Третий экзон гена *ATL1* соответствует ГТФазному домену белка. В этой области находится каталитически активная глутаминовая кислота в 117-м положении, которая участвует в гидролизе ГТФ [30]. На сегодняшний день аутосомно-доминантных случаев заболевания, связанных с патогенными вариантами в третьем экзоне гена, неизвестно, и описаны только две мутации — p.R118Q и p.R217*, идентифицированные в гомозиготном состоянии в семьях с аутосомно-рецессивной формой НСП [31, 32]. Обе эти мутации расположены в консервативном нуклеотид-связывающем сайте ГТФазного домена и предполагается, что они приводят к потере функции гена таким образом, что это не мешает аллелю дикого типа. У всех пациентов из семей с данными мутациями зарегистрирован ранний возраст манифестации — 1-й год жизни, неосложненная форма НСП, с развитием в третьей декаде жизни дисфункции тазовых органов, в частности недержания мочи [31, 32]. Большинство клинических признаков, описанных у больных членов этих семей, совпадает

с таковыми, выявленными у нашей пациентки с дупликацией 3-го экзона, кроме гораздо более позднего у нее возраста манифестации НСП — около 40 лет. Исходя из сведений о функциональной значимости данной области гена, можно предположить, что протяженная дупликация третьего экзона гена *ATL1*, выявленная нами в гетерозиготном состоянии у пациента с НСП, может оказывать значительный негативный эффект на ГТФазную функцию атласина, когда компенсация функции за счет аллеля дикого типа является неполной. Такой эффект мутации может быть связан с разными механизмами. В случае, если дупликация экзона представляет собой вставку нуклеотидной последовательности по количеству нуклеотидов некратному трем, то очевиден сдвиг рамки считывания, нарушающий всю кодирующую последовательность гена, как правило приводящий к образованию преждевременного стоп-кодона и как следствие — к нонсенс-опосредованному разрушению белка. Если же количество нуклеотидов вставки кратно трем, то предположительно негативный эффект может быть связан со значительным размером ее кодирующей части, причем с большой вероятностью того, что в этой части будут другие аминокислоты, так как начало экзона не всегда совпадает с триплетом. Однако эти заключения являются предположительными и требуют дальнейших исследований, поскольку мутация была выявлена методом МЛРА-анализа, не позволяющим установить точные границы инсерции.

Нуклеотидная замена с.1246C>T (p.Arg416Cys) в гене *ATL1* ранее была описана Orlacchio et al. [25], Magariello et al. [26] и Luo et al. [27] как патогенная мутация, обуславливающая НСП формы SPG3A с аутосомно-доминантным типом наследования. Клиническая картина НСП у пациентов, представленных в этих работах, несколько различается. Так, Orlacchio et al. [25] идентифицировали эту мутацию у 10 пациентов с АД НСП из одной южноафриканской семьи: у них у всех отмечался поздний возраст манифестации заболевания (от 39 до 51 года), а также у всех — умственная отсталость (IQ от 32 до 67).

Magariello et al. [26] такую же мутацию выявили у пациентки с НСП, у которой заболевание было впервые диагностировано в возрасте 40 лет, однако его первые признаки в виде трудностей при беге, судорог нижних конечностей и поясничных болей сама пациентка отмечала с более раннего возраста — после полового созревания. Заболевание у данной пациентки соответствовало неосложненной НСП, в частности когнитивных нарушений у нее выявлено не было. По данным исследования Luo et al. [27], в одной китайской семье с НСП, обусловленной мутацией p.Arg416Cys, у большинства больных членов семьи заболевание в неосложненной форме развилось до 10 лет, но у некоторых — в более позднем возрасте. Обобщая

приведенные выше сведения, можно заключить, что НСП, обусловленная мутацией с.1246С>Т в 12-м экзоне гена *ATL1*, может проявляться как в раннем (до 10 лет), так и гораздо в более позднем возрасте, часто — после 40 лет. В большинстве случаев НСП соответствует неосложненному типу, в рамках которого иногда могут присутствовать снижение вибрационной чувствительности в ногах или признаки дисфункции тазовых органов в виде затруднения мочеиспускания или недержания мочи; реже у носителей данной мутации спастическая параплегия может быть осложнена когнитивными нарушениями. По клиническим проявлениям может наблюдаться как межсемейная, так и внутрисемейная вариабельность, даже в случае однойцевых близнецов, что может свидетельствовать о роли эпигенетических факторов в развитии и течении болезни. В одной из наших семей установлено происхождение мутации с.1246С>Т *de novo*, что подтверждает существующее предположение о наличии “горячей точки” в 12-м экзоне гена. Также наряду с 12-м экзоном “горячими” считаются экзоны 4, 7 и 8 гена *ATL1*, и большинство (87.32%) известных мутаций в гене приходится на эти экзоны [19].

Zhao и Liu [19] провели обобщенный анализ гено-фенотипической корреляции по сведениям о пациентах с SPG3A из 142 семей, представленным в 51 публикации. Авторы показали, что у 84.79% пациентов с мутациями в гене *ATL1* наблюдается ранняя форма SPG3A, с возрастом манифестации <10 лет, и у 15.21% — более поздняя (>10 лет) форма заболевания. Это обстоятельство, подтверждаемое и нашими данными, подчеркивает необходимость анализа гена *ATL1* не только при ранних формах НСП. Кроме того, было показано, что по возрасту начала болезни даже при одной и той же мутации может наблюдаться как межсемейная, так и внутрисемейная неоднородность (в частности, при мутациях p.A161P и p.R495W [33, 34]). Сравнение клинических данных, проведенное в этом же исследовании, не выявило какой-либо корреляции генотип–фенотип при различных мутациях в гене *ATL1* [19]. Из 440 пациентов, для которых была доступна информация в исследовании этих авторов, у 378 больных (85.90%) была установлена “чистая” форма НСП и у 62 (14.10%) — осложненная форма болезни. Осложняющие симптомы у пациентов со спастической параплегией SPG3A включали судороги, атрофию зрительного нерва, сенсорные нарушения, умственную отсталость, атаксию, дистальную атрофию и периферическую аксональную невропатию. При этом авторы обнаружили, что дистальная атрофия является наиболее частым симптомом у пациентов с осложненными формами SPG3A. Включенные в клиническую картину неосложненной формы болезни снижение вибрационной чувствительности в ногах и дисфункция тазовых орга-

нов, выявленные в обследованной нами семье Л., при SPG3A встречаются гораздо реже, чем при других формах АД НСП [19].

Тяжесть заболевания у большинства пациентов с SPG3A отмечается как легкая, но степень спастичности увеличивается с продолжительностью заболевания. Пенетрантность заболевания составляет 80–90%, но в ряде семейных случаев у гетерозиготных носителей мутации в гене *ATL1* в преклонном возрасте неврологический статус остается в норме, что свидетельствует против возраст-зависимой пенетрантности [15]. Самый низкий процент пенетрантности (30%) был описан в семье с мутацией в соседнем, 415-м, кодоне гена *ATL1*: с.1243С>Т (p.Arg415Trp) [35].

В целом для мутаций в гене *ATL1* пока сложно провести четкие гено-фенотипические корреляции, но накопление данных по конкретным патогенным вариантам может способствовать пониманию таких взаимосвязей. В частности, полученные нами данные свидетельствуют о более позднем возрасте манифестации НСП и ее относительно легком течении при выявленных у наших пациентов мутациях в 3-м и 12-м экзонах, подтверждают сведения о неполной пенетрантности мутации с.1246С>Т и о существовании “горячей” точки в 12-м экзоне. Проведенное нами популяционное исследование также демонстрирует неоднородность распространения отдельных генетических форм НСП в различных регионах. В общей выборке из 63 пробандов с НСП, представителей, примерно, 70% всех зарегистрированных в Республике Башкортостан неродственных семей пациентов, вклад генетической формы SPG3 в структуру заболевания составил 6.3%, частота мутации с.1246С>Т (p.Arg416Cys) — 4.7%. Эти данные дополняют общую картину по спектру и частоте патогенных вариантов, приводящих к развитию НСП у пациентов обследуемого региона, и способствуют повышению эффективности генетического консультирования в семьях пациентов.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Минобрнауки РФ (№ АААА-А16-116020350032-1), при частичной финансовой поддержке Санкт-Петербургского государственного университета (проект № 93025749), гранта РФФИ (№ 17-44-020951) и Мегагранта Правительства Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-595). Для исследования использовано оборудование ЦКП “Биомика” (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП “Агидель”) и УНУ “КОДИНК”. Образцы ДНК для исследования взяты из “Коллекции биологических материалов человека” ИБГ УФИЦ РАН, поддержанной Программой биоресурсных коллекций ФАНО России (соглашение № 007-030164/2).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национально-го комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Исследования были одобрены биоэтическим комитетом ИБГ УФИЦ РАН.

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fink J.K. Hereditary spastic paraplegia: clinico-pathologic features and emerging molecular mechanisms // *Acta Neuropathologica*. 2013. V. 126. № 3. P. 307–328. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1115-8>
2. Hazan J., Fonknechten N., Mavel D. et al. Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia // *Nat. Genet.* 1999. V. 23. № 3. P. 296–303. <https://doi.org/10.1038/15472>
3. Finsterer J., Löscher W., Quasthoff S. et al. Hereditary spastic paraplegias with autosomal dominant, recessive, X-linked, or maternal trait of inheritance // *J. Neurological Sci.* 2012. V. 318. № 1. P. 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2012.03.025>
4. Fonknechten N., Mavel D., Byrne B. et al. Spectrum of SPG4 mutations in autosomal dominant spastic paraplegia // *Human Mol. Genet.* 2000. V. 9. № 4. P. 637–644. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.4.637>
5. Namekawa M., Nelson I., Ribai P. et al. A founder effect and mutational hot spots may contribute to the most frequent mutations in the SPG3A gene // *Neurogenetics*. 2006. V. 7. № 2. P. 131–132. <https://doi.org/10.1007/s10048-006-0028-2>
6. Zhu P.P., Soderblom C., Tao-Cheng J.H. et al. SPG3A protein atlastin-1 is enriched in growth cones and promotes axon elongation during neuronal development // *Human Mol. Genet.* 2006. V. 15. № 8. P. 1343–1353. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl054>
7. Namekawa M., Muriel M.P., Janer A. et al. Mutations in the SPG3A gene encoding the GTPase atlastin interfere with vesicle trafficking in the ER/Golgi interface and Golgi morphogenesis // *Mol. and Cellular Neuroscience*. 2007. V. 35. № 1. P. 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2007.01.012>
8. Rismanchi N., Soderblom C., Stadler J. et al. Atlastin GTPases are required for Golgi apparatus and ER morphogenesis // *Human Mol. Genet.* 2008. V. 17. № 11. P. 1591–1604. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn046>
9. Hu J., Shibata Y., Zhu P.P. et al. A class of dynamin-like GTPases involved in the generation of the tubular ER network // *Cell*. 2009. V. 138. № 3. P. 549–561. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.025>
10. Orso G., Pendin D., Liu S. et al. Homotypic fusion of ER membranes requires the dynamin-like GTPase atlastin // *Nature*. 2009. V. 460. № 7258. P. 978–983. <https://doi.org/10.1038/nature08280>
11. Park S.H., Zhu P.-P., Parker R.L., Blackstone C. Hereditary spastic paraplegia proteins REEP1, spastin, and atlastin-1 coordinate microtubule interactions with the tubular ER network // *The J. Clin. Investigation*. 2010. V. 120. № 4. P. 1097–1110. <https://doi.org/10.1172/JCI40979>
12. Zhao X., Alvarado D., Rainier S. et al. Mutations in a newly identified GTPase gene cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia // *Nat. Genet.* 2001. V. 29. № 3. P. 326–331. <https://doi.org/10.1038/ng758>
13. Tessa A., Casali C., Damiano M. et al. SPG3A an additional family carrying a new atlastin mutation // *Neurology*. 2002. V. 59. № 12. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000036902.21438.98>
14. Abel A., Fonknechten N., Hofer A. et al. Early onset autosomal dominant spastic paraplegia caused by novel mutations in SPG3A // *Neurogenetics*. 2004. V. 5. № 4. P. 239–243. <https://doi.org/10.1007/s10048-004-0191-2>
15. Dürr A., Camuzat A., Colin E. et al. Atlastin1 mutations are frequent in young-onset autosomal dominant spastic paraplegia // *Arch. Neurol.* 2004. V. 61. P. 1867–1872. <https://doi.org/10.1001/archneur.61.12.1867>
16. Hedera P., Fenichel G.M., Blair M., Haines J.L. Novel mutation in the SPG3A gene in an African American family with an early onset of hereditary spastic paraplegia // *Arch. Neurol.* 2004. V. 61. № 10. P. 1600–1603. <https://doi.org/10.1001/archneur.61.10.1600>
17. Sauter S.M., Engel W., Neumann L.M. et al. Novel mutations in the Atlastin gene (SPG3A) in families with autosomal dominant hereditary spastic paraplegia and evidence for late onset forms of HSP linked to the SPG3A locus // *Hum. Mutat.* 2004. V. 23. № 1. P. 98. <https://doi.org/10.1002/humu.9205>
18. Erfanian Omidvar M., Torkamandi S., Rezaei S. et al. Genotype–phenotype associations in hereditary spastic paraplegia: A systematic review and meta-analysis on 13,570 patients // *J. Neurol.* 2021. V. 268. P. 2065–2082. <https://doi.org/10.1007/s00415-019-09633-1>
19. Zhao G.-H., Liu X.-M. Clinical features and genotype–phenotype correlation analysis in patients with ATL1 mutations: a literature reanalysis // *Transl. Neurodegen.* 2017. V. 6. № 1. P. 9. <https://doi.org/10.1186/s40035-017-0079-3>
20. Магжанов Р.В., Сайфуллина Е.В., Идрисова Р.Ф. и др. Эпидемиологическая характеристика наследственных спастических параплегий в Республике Башкортостан // *Мед. генетика*. 2013. № 7. С. 12–16.
21. Ахметгалеева А.Ф., Хидиятова И.М., Сайфуллина Е.В. и др. Две новые мутации в гене *SPG4* у пациентов с аутосомно-доминантной спастической параплегией из Республики Башкортостан // *Генетика*. 2016. Т. 52. № 6. С. 691–696.
22. Ахметгалеева А.Ф., Хидиятова И.М., Сайфуллина Е.В. и др. Клинический случай спорадической спастической параплегии при новой мутации в гене *SPAST* // *Мед. генетика*. 2016. № 7. С. 11–13.
23. Хидиятова И.М., Ахметгалеева А.Ф., Сайфуллина Е.В. и др. Мажорная мутация в гене *SPAST* у пациентов

- с аутосомно-доминантной спастической параплегией из Республики Башкортостан // Генетика. 2019. Т. 55. № 2. С. 229–233.
24. *Mathew C.G.P.* The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA // *Nucl. Acids. Res.* 1984. P. 31–34.
 25. *Orlacchio A., Montieri P., Babalini C. et al.* Late-onset hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum caused by a new SPG3A mutation // *J. Neurol.* 2011. V. 258. № 7. P. 1361–1363. <https://doi.org/10.1007/s00415-011-5934-z>
 26. *Magariello A., Tortorella C., Citrigno L. et al.* The p.Arg416Cys mutation in SPG3a gene associated with a pure form of spastic paraplegia // *Muscle Nerve.* 2012. V. 45. № 6. P. 919–920. <https://doi.org/10.1002/mus.23360>
 27. *Luo Y., Chen C., Zhan Z. et al.* Mutation and clinical characteristics of autosomal-dominant hereditary spastic paraplegias in China // *Neurodegen. Dis.* 2014. V. 14. № 4. P. 176–183. <https://doi.org/10.1159/000365513>
 28. *Sulek A., Elert E., Rajkiewicz M. et al.* Screening for the hereditary spastic paraplegias SPG4 and SPG3A with the multiplex ligation-dependent probe amplification technique in a large population of affected individuals // *Neurol. Sci.* 2012. V. 34. № 2. P. 239–242. <https://doi.org/10.1007/s10072-011-0899-3>
 29. *Beetz C., Nygren A.O.H., Deufel T., Reid E.* An SPG3A whole gene deletion neither co-segregates with disease nor modifies phenotype in a hereditary spastic paraplegia family with a pathogenic SPG4 deletion // *Neurogenetics.* 2007. V. 8. P. 317–318. <https://doi.org/10.1007/s10048-007-0099-8>
 30. *Bian X., Klemm R.W., Liu T.Y. et al.* Structures of the atlastin GTPase provide insight into homotypic fusion of endoplasmic reticulum membranes // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. № 10. P. 3976–3981. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101643108>
 31. *Khan T.N., Klar J., Tariq M. et al.* Evidence for autosomal recessive inheritance in SPG3A caused by homozygosity for a novel ATL1 missense mutation // *Eur. J. Hum. Genet.* 2014. V. 22. P. 1180–1184. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.5>
 32. *Willkomm L., Heredia R., Hoffmann K. et al.* Homozygous mutation in Atlastin GTPase 1 causes recessive hereditary spastic paraplegia // *J. Hum. Genet.* 2016. V. 61. № 6. P. 571–573. <https://doi.org/10.1038/jhg.2016.6>
 33. *Scarano V., Mancini P., Criscuolo C. et al.* The R495W mutation in SPG3A causes spastic paraplegia associated with axonal neuropathy // *J. Neurol.* 2005. V. 252. P. 901–903. <https://doi.org/10.1007/s00415-005-0768-1>
 34. *Ivanova N., Claeys K.G., Deconinck T. et al.* Hereditary spastic paraplegia 3A associated with axonal neuropathy // *Arch. Neurol.* 2007. V. 64. P. 706–713. <https://doi.org/10.1001/archneur.64.5.706>
 35. *D'Amico A., Tessa A., Sabino A. et al.* Incomplete penetrance in an SPG3A-linked family with a new mutation in the atlastin gene // *Neurology.* 2004. V. 62. P. 2138–2139. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000127698.88895.85>

Analysis of *ATL1* Gene Mutations and Clinical Features of the Disease Course in Patients with Hereditary Spastic Paraplegia

I. M. Khidiyatova^{a, b, c, *}, E. V. Saifullina^d, A. S. Karunas^{a, b, c}, A. F. Akhmetgaleyeva^d, R. F. Kutlubaeva^d, L. A. Smakova^a, S. L. Lobov^a, A. V. Polyakov^e, O. A. Shchagina^e, V. A. Kadnikova^e, O. P. Ryzhkova^e, R. V. Magzhanov^d, and E. K. Khusnutdinova^{a, b, c}

^a*Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*

^b*Bashkir State University, Ufa, 450076 Russia*

^c*Saint Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia*

^d*Bashkir State Medical University, Ufa, 450000 Russia*

^e*Medical Genetic Research Center, Moscow, 115522 Russia*

^{*}*e-mail: imkhid@mail.ru*

Hereditary spastic paraplegia (HSP) is a group of neurodegenerative disorders with a predominant lesion of the pyramidal tract. The autosomal dominant form of SPG3A, associated with mutations in the *ATL1* gene, is one of the most common forms of HSP in European populations. Analysis of the *ATL1* gene was performed in 63 unrelated families with HSP from the Bashkortostan Republic (BR). Two pathogenic variants were identified: one patient had a duplication of the entire 3rd exon, and 7 patients from 3 unrelated families had a missense mutation c.1246C>T (p.Arg416Cys). The frequency of SPG3A among unrelated patients in the BR was 6.3%. In one of the examined families, the origin of the c.1246C>T *de novo* mutation was established. The clinical symptoms of the disease in most cases corresponded to uncomplicated HSP, occurring in a mild form. Intrafamilial differences in clinical manifestations of the disease, including in identical twins, were revealed. The age of manifestation in the majority of examined patients ranged from 10 to 50 years.

Keywords: hereditary spastic paraplegia, *ATL1* gene, mutations, MLPA, NGS, Bashkortostan Republic.

СВЯЗЬ ПОЛИМОРФНЫХ МАРКЕРОВ ГЕНОВ *TP53*, *MDM2* И *CDKN1A*
С РИСКОМ РАЗВИТИЯ РАКА ЯИЧНИКА© 2022 г. П. К. Бреннер¹, М. А. Капралова¹, Д. С. Ходырев², С. В. Хохлова³, Г. Н. Хабас³,
А. В. Асатурова³, Ю. В. Носова³, Л. Н. Каюмова⁴, Т. М. Заварькина¹, *¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, 119334 Россия²Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий
Федерального медико-биологического агентства России, Москва, 115682 Россия³Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии
им. В.И. Кулакова, Москва, 117198 Россия⁴Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова
(Сеченовский университет), Москва, 119435 Россия

*e-mail: tpalievskaya@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.12.2021 г.

После доработки 04.03.2022 г.

Принята к публикации 14.03.2022 г.

В работе получено распределение частот аллелей полиморфных участков генов системы апоптоза и контроля клеточного цикла *TP53* (rs1042522), *MDM2* (rs2279744) и *CDKN1A* (rs1801270) и проанализирована их связь с риском развития рака яичника у женщин Московского региона. В исследование включены 70 здоровых женщин-доноров и 66 больных раком яичника. Материалом исследования служила ДНК, выделенная из крови здоровых доноров и ткани и крови больных раком яичника. Определение статуса полиморфных маркеров генов проводилось методом ПЦР в реальном времени с флуоресцентными аллель-специфичными зондами. В ходе работы получены отношения шансов (ОШ) риска развития рака яичника: для аллеля *Pro* маркера *Arg72Pro* гена *TP53* ОШ = 0.94, 95% ДИ = 0.57–1.65, $p = 1.0$; для аллеля *G* маркера *T(-410)G* гена *MDM2* ОШ = 0.96, 95% ДИ = 0.49–1.89, $p = 0.90$; для аллеля *Arg* маркера *Ser31Arg* гена *CDKN1A* ОШ = 1.53, 95% ДИ = 0.76–3.09, $p = 0.29$. Для данных маркеров получены результаты, указывающие на отсутствие ассоциации с раком яичника. Выявлено, что носительство минорных аллелей маркеров *Arg72Pro* гена *TP53*, *T(-410)G* гена *MDM2* и *Ser31Arg* гена *CDKN1A* не влияет на риск развития рака яичника у женщин Московского региона.

Ключевые слова: рак яичника, полиморфный маркер, контроль клеточного цикла, апоптоз.

DOI: 10.31857/S0016675822090065

Рак яичника (РЯ) является второй причиной смертности среди онкогинекологических заболеваний в мире [1]. За 2020 г. в Российской Федерации выявлено 12444 новых случаев опухолей яичников. Распространенность данного заболевания составила 80.4 случаев на 100 тыс. населения [2]. Современная теория канцерогенеза основывается на том, что помимо внешних факторов, для возникновения опухоли важно наличие генетической предрасположенности [3]. Известно, что патогенез РЯ в ряде случаев, чаще всего при наследственном варианте заболевания, тесно связан с мутациями генов-онкосупрессоров *BRCA1* и *BRCA2* [4]. Однако мутации в этих генах отвечают за 10–15% случаев РЯ. Установлено, что в поддержании стабильности генома клетки и предотвращении неопластической трансформации участвует система апоптоза и контроля клеточного цикла. Возникновение злокачественных новообразований часто связано с нару-

шением в ее функционировании. Ключевыми в системе апоптоза и контроля клеточного цикла являются гены *TP53*, *MDM2* и *CDKN1A*. В литературе описано, что полиморфные маркеры этих генов связаны с повышенным риском развития ряда онкологических заболеваний, в частности, рака шейки матки, рака молочной железы, рака эндометрия, лейкоза [5–8].

В норме, в неповрежденных клетках, продукт гена *TP53* – белок p53, нестабилен и присутствует в очень низкой концентрации за счет его связывания с белком mdm2 [9]. При повреждении структуры ДНК фосфорилирование p53 снижает его связывание с mdm2. Затем белок mdm2 деградирует, что позволяет p53 накапливаться, полностью активироваться и индуцировать транскрипцию гена *CDKN1A*. Продукт гена *CDKN1A* – белок p21, взаимодействует с комплексом циклина и циклин-зависимых киназ Cyclin-CDK2/CDK1,

Таблица 1. Условия проведения анализа молекулярно-генетических маркеров

Маркер	Праймеры и зонды	$T_{отж}$, °C/ длина ампликона, пн
<i>Arg72Pro</i> <i>TP53</i> rs1042522	F: GGTGTAGGAGCTGCTGGTG R: CTGGTAAGGACAAGGGTTGGG FAM-AGGGGCCACGGGGGGAGCAG-BHQ-1 VIC-AGGGGCCACGCGGGGAGCAG-BHQ-2	63.4/271
<i>T(-410)G</i> <i>MDM2</i> rs2279744	F: GCGGGATTTTCGGACGGCTCTC R: CCCGACAGGCACCTGCGA FAM-CGGGGCCGCTTCGGCGCGGG-BHQ-1 VIC-CGGGGCCGCTGCGGCGCGGG-BHQ-2	66.4/145
<i>Ser31Arg</i> <i>CDKN1A</i> rs1801270	F: CTGGAAGGAGTGAGAGAG R: GGTGACAAAGTCGAAGTTC FAM-AGCTGAGCCGCGACTGT-BHQ-1 VIC-AGCTGAGACGCGACTGT-BHQ-2	63.8/296

Примечание. F и R – праймеры, где F – forward (прямой), R – reverse (обратный); FAM и VIC – ДНК-зонды, меченные соответствующими флуоресцентными красителями, минорному варианту маркера соответствует зонд VIC; $T_{отж}$ – температура отжига.

ингибирует его активность и предотвращает вступление клетки в S-фазу, вызывая тем самым длительную остановку клеточного цикла [10]. Исследование полиморфных маркеров наиболее важных генов контроля клеточного цикла и апоптоза при РЯ позволит лучше понимать патогенез этого заболевания.

Цель работы – изучение связи между статусом полиморфных маркеров генов *TP53* (*Arg72Pro*), *MDM2* (*T(-410)G*) и *CDKN1A* (*Ser31Arg*) и риском развития РЯ.

Исследуемые биологические образцы получены из ФГБУ “НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова” Минздрава России. Исследование проводилось с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с Федеральным законом “Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации” (от 21.11.2011 № 323-ФЗ).

Критериями включения пациентов в работу были удовлетворительное общее состояние, нормальная функция кровотока, почек, печени, морфологически подтвержденный диагноз РЯ. Диагноз и гистологическая форма РЯ устанавливались на основании гистологического исследования в НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова. В ходе работы изучена венозная кровь от 70 здоровых женщин-доноров с медианой возраста 48 лет (23–70), опухолевая ткань от 66 больных РЯ (Ia–IV стадия) с медианой возраста 51 год (28–75), у части больных (37 человек) также отобраны образцы крови. Забор образцов крови проводился до начала химиотерапии, образцы опухолевой ткани получены в ходе первичной циторедуктивной операции.

Материалом для исследования служила ДНК, выделенная из крови и ткани с использованием

набора реагентов Diatom DNA Prep 400 (“Лаборатория Изоген”, Россия).

Определение статуса полиморфных маркеров *Arg72Pro* гена *TP53*, *T(-410)G* гена *MDM2* и *Ser31Arg* гена *CDKN1A* осуществляли методом ПЦР в реальном времени с флуоресцентными аллельспецифичными зондами на термоциклере “CFX96 Touch Real-Time System” (Bio-Rad, США). Аллельную дискриминацию проводили с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager. Последовательности и температура отжига ($T_{отж}$) использованных в работе праймеров и зондов указаны в табл. 1. Реакции проводили в 20 мкл реакционной смеси следующего состава: 70 мМ Трис-НСl, рН 8.8, 16.6 мМ сульфат аммония, 0.01%-ный Твин-20, 2 мМ хлорида магния, 200 нМ каждого dNTP, 500 нМ праймеров (“Евроген”, Россия), 250 нМ флуоресцентных зондов (“ДНК-Синтез”, Россия), 1.5 ед. Таq ДНК-полимеразы (“Евроген”). Условия амплификации фрагментов ДНК: 95°C – 20 с; 40 циклов: 95°C – 10 с, $T_{отж}$ – 30 с, 72°C – 30 с.

Статистический анализ проводился в программе Statistica 8.0 (StatSoft). При сравнении частот аллелей и генотипов использовался стандартный критерий χ^2 Пирсона. Полученные результаты проверялись на соблюдение равновесия Харди–Вайнберга для каждого исследуемого полиморфного маркера в программе Arlequin 3.0. Комплексную оценку взаимосвязи между исследуемыми аллелями, генотипами и риском заболевания проводили с помощью программы Calculator for confidence intervals of odds ratio [11], определяя отношение шансов (ОШ) и 95%-ный доверительный интервал (95% ДИ). Различия при значениях $p < 0.05$ оценивались как значимые.

Таблица 2. Распределение частот генотипов полиморфных маркеров генов *TP53*, *MDM2* и *CDKN1A* у больных РЯ и здоровых доноров

Ген	Генотип	Частоты генотипов	
		опухолевая ткань ($n = 66$)	контроль ($n = 70$)
<i>TP53</i> (<i>Arg72Pro</i>)	<i>Arg/Arg</i>	0.621	0.543
	<i>Arg/Pro</i>	0.197	0.343
	<i>Pro/Pro</i>	0.182	0.114
<i>MDM2</i> (<i>T(-410)G</i>)	<i>T/T</i>	0.439	0.429
	<i>T/G</i>	0.394	0.400
	<i>G/G</i>	0.167	0.171
<i>CDKN1A</i> (<i>Ser31Arg</i>)	<i>Ser/Ser</i>	0.818	0.743
	<i>Ser/Arg</i>	0.136	0.186
	<i>Arg/Arg</i>	0.046	0.071

Таблица 3. Расчет отношения шансов риска развития РЯ для аллелей полиморфных маркеров генов *TP53*, *MDM2* и *CDKN1A*

Аллель	ОШ	95% ДИ	χ^2	p
Аллели гена <i>TP53 Arg72Pro</i>				
Аллель <i>Arg</i>	1.03	0.61–1.74	0.92	1.0
Аллель <i>Pro</i>	0.94	0.57–1.65		
Аллели гена <i>MDM2 T(-410)G</i>				
Аллель <i>T</i>	0.97	0.59–1.58	0.89	0.90
Аллель <i>G</i>	0.96	0.49–1.89		
Аллели гена <i>CDKN1A Ser31Arg</i>				
Аллель <i>Ser</i>	1.53	0.76–3.09	0.23	0.29
Аллель <i>Arg</i>	0.65	0.32–1.31		

Примечание. ОШ – отношение шансов, ДИ – доверительный интервал.

В ходе работы изучено распределение генотипов полиморфных маркеров *Arg72Pro* гена *TP53*, *T(-410)G* гена *MDM2* и *Ser31Arg* гена *CDKN1A* у здоровых доноров и больных РЯ. В табл. 2 представлены частоты распределения генотипов маркеров исследуемых генов. Установлено, что распределение частот генотипов полиморфных маркеров среди контрольной группы находится в равновесии Харди–Вайнберга ($p > 0.8$). При сравнении распределения частот аллелей для крови ($n = 37$) и ткани ($n = 66$), полученных от больных РЯ, не обнаружено различий между ними (точный тест Фишера, $p = 0.52–0.77$). С целью увеличения статистической мощности работы были использованы результаты для образцов ткани.

На основании полученных данных проведен расчет риска развития РЯ. Результаты для каждого из аллелей исследуемых генов представлены в табл. 3. Выявлено отсутствие различий в частоте распределения аллелей маркеров в группах здоровых доноров и больных РЯ и, следовательно,

связи с риском развития РЯ для аллелей маркеров ($p = 0.29–1.0$).

Результаты расчета отношения шансов риска развития РЯ для каждого из генотипов исследуемых генов, вычисленные с использованием кодоминантной модели наследования, представлены в табл. 4. Для маркера *Arg72Pro* гена *TP53* (при использовании кодоминантной модели) носительство генотипа *Pro/Pro* связано с тенденцией к повышению риска развития РЯ (ОШ = 1.55, 95% ДИ = 0.39–4.36, $p = 0.13$). В случае доминантной и рецессивной моделей наследования связи с развитием РЯ не выявлено (ОШ = 0.72, 95% ДИ = 0.37–1.44, $p = 0.39$ и ОШ = 1.72, 95% ДИ = 0.66–3.31, $p = 0.34$ соответственно).

При изучении генотипов маркера *T(-410)G* гена *MDM2* с использованием кодоминантной и рецессивной моделей наследования связь с риском РЯ не обнаружена (ОШ = 1.0, 95% ДИ = 0.33–3.02, $p = 1.0$ и ОШ = 0.97, 95% ДИ = 0.39–2.37, $p = 1.0$ со-

Таблица 4. Расчет отношения шансов риска развития РЯ для генотипов полиморфных маркеров генов *TP53*, *MDM2* и *CDKN1A*

Аллель	ОШ	95% ДИ	χ^2	<i>p</i>
Генотипы гена <i>TP53 Arg72Pro</i>				
<i>Arg/Arg</i>	1.03	0.30–3.39	4.07	0.13
<i>Arg/Pro</i>	0.61	0.22–2.45		
<i>Pro/Pro</i>	1.55	0.39–4.36		
Генотипы гена <i>MDM2 T(-410)G</i>				
<i>T/T</i>	1.03	0.34–3.07	0.02	1.0
<i>T/G</i>	0.97	0.33–2.95		
<i>G/G</i>	1.00	0.33–3.02		
Генотипы гена <i>CDKN1A Ser31Arg</i>				
<i>Ser/Ser</i>	1.53	0.26–8.00	1.15	0.62
<i>Ser/Arg</i>	0.67	0.13–3.87		
<i>Arg/Arg</i>	1.05	0.19–5.75		

Примечание: ОШ – отношение шансов, ДИ – доверительный интервал.

ответственно) также, как и в случае доминантной модели (ОШ = 0.59; 95% ДИ = 0.3–1.16; $p = 0.17$).

Ассоциации генотипов маркера *Ser31Arg* гена *CDKN1A* с развитием РЯ также обнаружено не было (кодоминантная модель: ОШ = 1.05, 95% ДИ = 0.19–5.75, $p = 0.62$; доминантная модель: ОШ = 1.44, 95% ДИ = 0.63–3.31, $p = 0.41$; рецессивная модель: ОШ = 0.62, 95% ДИ = 0.14–2.70, $p = 0.72$).

Нами выявлено, что носительство аллеля *Pro* полиморфного маркера *Arg72Pro* гена *TP53* не связано с риском развития РЯ у женщин Московского региона. Подобные результаты получены в мета-анализе А. Zhang с соавт., где при исследовании выборки, состоящей в основном из европейцев (90.1% среди больных РЯ и 89.4% среди контрольной группы), получено, что аллель *Pro* не связан с повышенным риском развития РЯ (ОШ = 1.06, 95% ДИ = 0.93–1.20) [12]. При рассмотрении генотипов в нашей работе выявлена тенденция к повышению риска развития РЯ для генотипа *Pro/Pro* в случае кодоминантной модели наследования. Схожие данные получены S. Dholariya с соавт. при анализе распределения генотипов в индийской популяции. Авторами установлено, что носительство генотипа *Pro/Pro* полиморфного маркера *Arg72Pro* связано с повышенным риском развития РЯ (ОШ = 4.40, 95% ДИ = 1.40–13.99) [13].

При изучении полиморфного маркера *T(-410)G* гена *MDM2* связи с риском развития РЯ как для аллелей, так и для генотипов маркера нами не выявлено. При анализе литературы не обнаружено подобных работ, посвященных исследованию связи маркера *T(-410)G* гена *MDM2* с риском развития РЯ. Однако L.V. Gansmo с соавт. показали отсутствие связи с риском развития дан-

ного вида опухоли для другого полиморфного маркера del1518 (rs3730485) гена *MDM2* [14]. В ходе работы установлено, что носительство минорного аллеля *Arg* маркера гена *CDKN1A* не связано с повышением риска развития РЯ. В научной литературе отсутствуют работы по исследованию связи маркера *Ser31Arg* гена *CDKN1A* с развитием данного заболевания.

Таким образом, в настоящей работе выявлено, что носительство минорных аллелей генов контроля клеточного цикла *TP53*, *MDM2*, *CDKN1A* не связано с риском развития РЯ у жительниц Московского региона. Понимание патогенеза онкологических заболеваний важно не только с фундаментальной, но и с клинической точки зрения, оно может позволить выявлять новые мишени и возможности для терапии. Связь функционально значимых полиморфных маркеров генов с риском развития определенного вида рака показывает, насколько важен данный ген для патогенеза этого заболевания. В случае отсутствия связи, полученные результаты не менее важны, так как позволяют сфокусировать исследования на более перспективных вариантах.

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

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Global Cancer Observatory (GCO). IARC, 150 Cours Albert Thomas, 69372 Lyon CEDEX 08, France, 2021. Режим доступа: <https://gco.iarc.fr/>
2. Состояние онкологической помощи населению России в 2020 году / Ред. Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, 2021. 239 с.
3. Carbone M., Arron S.T., Beutler B. et al. Tumor predisposition and cancer syndromes as models to study gene X environment interactions // *Nat. Rev. Cancer*. 2020. V. 9. № 20. P. 533–549. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0265-y>
4. Yoshida R. Hereditary breast and ovarian cancer (HBOC): Review of its molecular characteristics, screening, treatment, and prognosis // *Breast Cancer*. 2021. V. 28. № 6. P. 1167–1180. <https://doi.org/10.1007/s12282-020-01148-2>
5. Garavand A.L., Mohammadi M., Mohammadzadeh S. Evaluation of *TP53* Codon 72, *P21* Codon 31, and *MDM2* SNP309 polymorphisms in Iranian patients with acute lymphocytic leukemia // *Rep. Biochem. Mol. Biol.* 2020. V. 9. № 1. P. 26–32. <https://doi.org/10.29252/rbmb.9.1.26>
6. Kamiza A.B., Kamiza S., Singini M.G., Mathew Ch.G. Association of *TP53* rs1042522 with cervical cancer in the sub-Saharan African population: A meta-analysis // *Trop. Med. Int. Health*. 2020. V. 25. № 6. P. 666–672. <https://doi.org/10.1111/tmi.13397>
7. Korobeinikova E., Ugenskiene R., Insodaite R. et al. The role of functional polymorphisms in oxidative stress-related genes on early-stage breast cancer survival // *Int. J. Biol. Markers*. 2021. V. 36. № 2. P. 14–21. <https://doi.org/10.1177/17246008211011177>
8. Zhang J., Zhang Y., Zhang Zh. Association of rs2279744 and rs117039649 promoter polymorphism with the risk of gynecological cancer // *Medicine (Baltimore)*. 2018. V. 97. № 2. P. e9554. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000009554>
9. Levine A.J. p53: 800 million years of evolution and 40 years of discovery // *Nat. Rev. Cancer*. 2020. V. 8. № 20. P. 471–480. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0262-1>
10. Hauge S., Macurek L., Syljuasen R.G. p21 limits S phase DNA damage caused by the Wee1 inhibitor MK1775 // *Cell Cycle*. 2019. V. 18. № 18. P. 834–847. <https://doi.org/10.1080/15384101.2019.1593649>
11. MedCalc Software Ltd, 2021. Режим доступа: <https://www.medcalc.org/contact/>
12. Zhang A., Shi T., Zhao Y. et al. No association between *TP53 Arg72Pro* polymorphism and ovarian cancer risk: Evidence from 10113 subjects // *Oncotarget*. 2017. V. 68. № 8. P. 112761–112769. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22603>
13. Dholariya S., Mir R., Zuberi M. et al. Potential impact of (rs 4645878) BAX promoter –248G>A and (rs1042522) *TP53 72Arg>Pro* polymorphisms on epithelial ovarian cancer patients // *Clin. Transl. Oncol.* 2016. V. 18. № 1. P. 73–81. <https://doi.org/10.1007/s12094-015-1338-3>
14. Gansmo L.B., Bjornslett M., Halle M.K. et al. *MDM2* promoter polymorphism del1518 (rs3730485) and its impact on endometrial and ovarian cancer risk // *BMC Cancer*. 2017. V. 17. № 1. P. 97. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3094-y>

Association of Polymorphic Markers of the *TP53*, *MDM2*, and *CDKN1A* Genes with the Risk of Ovarian Cancer

P. K. Brenner^a, M. A. Kapralova^a, D. S. Khodyrev^b, S. V. Khokhlova^c, G. N. Khabas^c,
A. V. Asaturova^c, Yu. V. Nosova^c, L. N. Kayumova^d, and T. M. Zavarykina^{a, *}

^aEmanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

^bFederal Scientific and Clinical Center of Specialized Types of Medical Care and Medical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of the Russian Federation, Moscow, 115682 Russia

^cKulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, 117198 Russia

^dSechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, 119435 Russia

*e-mail: tpalievskaya@yandex.ru

The distribution of allele frequencies of polymorphic markers of genes of the apoptosis and cell cycle control system *TP53* (rs1042522), *MDM2* (rs2279744), and *CDKN1A* (rs1801270) was obtained. The relationship of studied markers with the risk of ovarian cancer was analyzed. The study included 70 healthy female donors and 66 ovarian cancer patients. DNA was isolated from the blood of healthy donors and ovarian tumor tissues. The polymorphic markers were determined by real-time PCR with fluorescent allele-specific probes. The odds ratios (OR) of ovarian cancer risk were obtained: for the allele of the *Pro* marker *Arg72Pro* of the *TP53* gene OR = 0.94, 95% CI = 0.57–1.65, $p = 1.0$; for the allele of the *G* marker *T(–410)G* of the *MDM2* gene OR = 0.96, 95% CI = 0.49–1.89, $p = 0.90$; for the *Arg* allele of the *Ser31Arg* marker of the *CDKN1A* gene OR = 1.53, 95% CI = 0.76–3.09, $p = 0.29$. For these markers, the results indicating the absence of association with ovarian cancer were obtained. It was revealed that the carriage of minor alleles of the *Arg72Pro* marker of the *TP53* gene, *T(–410)G* marker of the *MDM2* gene and *Ser31Arg* of the *CDKN1A* gene did not affect the risk of ovarian cancer in residents of the Moscow region.

Keywords: ovarian cancer, polymorphic marker, cell cycle control, apoptosis.