

**ВЕСТНИК
ТОМСКОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО
УНИВЕРСИТЕТА
БИОЛОГИЯ**

Tomsk State University Journal of Biology

Научный журнал

2025

№ 69

Зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере
массовых коммуникаций, связи и охраны культурного наследия
(свидетельство о регистрации ПИ № ФС 77-29499 от 27 сентября 2007 г.)

Подписной индекс в объединённом каталоге «Пресса России» 44024

Журнал включен в «Перечень рецензируемых научных изданий, в которых
должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций
на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой
степени доктора наук» Высшей аттестационной комиссии



Учредитель – Томский государственный университет

Научный журнал «Вестник Томского государственного университета. Биология» публикует результаты завершённых оригинальных исследований (теоретические и экспериментальные статьи) в различных областях современной биологии, ранее нигде не публиковавшиеся и не представленные к публикации в другом издании; публикуются описания принципиально новых методов исследования, обзорные статьи по отдельным проблемам. Основные требования к представляемым рукописям: новизна и обоснованность фактического материала, ясность, сжатость изложения, воспроизводимость экспериментальных данных. Решение о публикации принимается редколлегией после рецензирования, учитывая соответствие материала тематике журнала, актуальность проблемы, научную и практическую новизну и значимость, профессионализм выполнения работы. Принимаются статьи на русском и английском языках. Средний срок публикации 6–9 месяцев. Журнал выходит ежеквартально. Публикации осуществляются на некоммерческой основе. Все опубликованные материалы находятся в свободном доступе.

Индексируется: SCOPUS; Web of Science (Biological Abstracts, BIOSIS Previews, Emerging Sources Citation Index, Zoological Record, RSCI); Google Scholar; eLIBRARY.RU; CYBERLENINKA. Внесён в Ulrich's Periodicals Directory.

Адрес издателя и редакции: 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36, Национальный исследовательский Томский государственный университет, Биологический институт; сайт: <http://journals.tsu.ru/biology/>

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Воробьев Д.С. – гл. редактор (Томский государственный университет, Томск, Россия)
Покровский О.С. – зам. гл. редактора (Национальный центр научных исследований, Тулуза, Франция)
Артемов Г.Н. – отв. редактор (Томский государственный университет, Томск, Россия)
Баранова О.Г. – отв. редактор (Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, Россия)
Бобровский М.В. – отв. редактор (Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, Пушкино, Россия)
Волокитина А.В. – отв. редактор (Институт леса им. В.Н. Сукачёва СО РАН, Красноярск)
Горошкевич С.Н. – отв. редактор (Институт мониторинга климатических и экологических систем СО РАН, Томск, Россия)
Громоных Т.И. – отв. редактор (Московский политехнический университет, Москва, Россия)
Денисов Е.В. – отв. редактор (НИИ онкологии Томского НИМЦ РАН, Томск, Россия)
Дорогина О.В. – отв. редактор (Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, Новосибирск, Россия)
Зверев А.А. – отв. редактор (Томский государственный университет, Томск, Россия)
Иванов Ю.В. – отв. редактор (Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия)
Кривец С.А. – отв. редактор (Институт мониторинга и климатических систем РАН, Томск)
Кулижский С.П. – отв. редактор (Томский государственный университет, Томск, Россия)
Лойко С.В. – отв. редактор (Томский государственный университет, Томск, Россия)
Минеева Н.М. – отв. редактор (Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанова РАН, пос. Борок)
Симакова А.В. – отв. редактор (Томский государственный университет, Томск, Россия)
Тарасов В.В. – отв. редактор (Институт экологии растений и животных УрО РАН, Екатеринбург, Россия)
Франк Ю.А. – отв. редактор (Томский государственный университет, Томск, Россия)
Шефтель Б.И. – отв. редактор (Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, Россия)
Штерншис М.В. – отв. редактор (Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты растений, Краснодар, Россия)
Ряудина Т.В. – отв. секретарь (Томский государственный университет, Томск, Россия)
e-mail: biotsu@mail.ru

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Александровский А.Л. (Институт географии РАН, Москва, Россия); **Ананьева Н.Б.** (Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, Россия); **Афтанас Л.И.** (НИИ физиологии и экспериментальной медицины СО РАМН, Новосибирск, Россия); **Васильева Е.Д.** (Зоомузей МГУ, Москва, Россия); **Дюбуа А.** (Национальный музей естественной истории, Париж, Франция); **Зеллер Б.** (Национальный институт агрономических исследований, Нанси, Франция); **Зипченко Т.Д.** (Институт экологии Волжского бассейна РАН, Тольятти, Россия); **Кингма Г.** (Маастрихтский университет, Маастрихт, Нидерланды); **Крюков В.Ю.** (Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск, Россия); **Кузнецов Вл.В.** (Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия); **Лодыгин Е.Д.** (Институт биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, Коми научный центр УрО РАН, Сыктывкар, Россия); **Лунашин В.В.** (Университет Арканзаса медицинских наук, Арканзас, США); **Максимов Т.Х.** (Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, Якутск, Россия); **Носов А.М.** (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия); **Олеников Д.Н.** (Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, Россия); **Пердисс А.** (Национальный Музей естественных наук, Мадрид, Испания); **Смирнова О.В.** (Центр по проблемам экологии и продуктивности лесов РАН, Москва, Россия); **Соколова Ю.Я.** (Университет Луизианы, Батон Руж, Луизиана, США); **Степанов В.А.** (НИИ медицинской генетики Томского НЦ СО РАМН, Томск, Россия); **Торчик В.И.** (Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Беларусь); **Шарахов И.В.** (Политехнический университет Вирджинии, Вирджиния, США).

Издательство: Издательство Томского государственного университета. Редактор В.Г. Лихачева; редактор-переводчик В.В. Воздвиженский; оригинал-макет А.И. Лелююр; дизайн обложки Л.Д. Кривцова

Подписано в печать 02.03.2025 г. Формат 70×108^{1/16}. Усл. печ. л. 15,7. Тираж 50 экз. Заказ № 6244. Цена свободная. Дата выхода в свет 01.04.2025 г.

Журнал отпечатан на полиграфическом оборудовании Издательства ТГУ. 634050, Ленина, 36, Томск, Россия. Тел. 8+(382-2)-52-98-49. Сайт: <http://publish.tsu.ru>. E-mail: rio.tsu@mail.ru

© Томский государственный университет, 2025

**About *Vestnik Tomskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Biologiya* =
Tomsk State University Journal of Biology**

Founder – Tomsk State University

Tomsk State University Journal of Biology is a quarterly international and peer-reviewed scientific journal publishing the results of the completed experimental research, reviews and novel methods of research in Biological Sciences on the basis of its originality, importance, scientific character, validity, precision and clarity. The Journal is intended for a broad range of scientists and experts in biology and ecology.

The editorial board of the *Tomsk State University Journal of Biology* commits to the internationally accepted principles of publication ethics expressed.

International standard serial edition number: EISSN 2311-2077, ISSN 1998-8591

Language: Russian, English

Publications are on non-commercial basis (FREE)

Open access

Publication timeframe: 6-9 months

All manuscripts are to be reviewed: double blind peer review (2-10-weeks)

Abstracting and Indexing: SCOPUS; Web of Science (Biological Abstracts, BIOSIS Previews, Emerging Sources Citation Index, Zoological Record, RSCI); Google Scholar; eLIBRARY.RU; CYBERLENINKA; Ulrich's Periodicals Directory

Contact the Journal

Tomsk State University, Institute of Biology, 36 Lenin Ave., Tomsk 634050, Russian Federation

e-mail: biotsu@mail.ru, <http://journals.tsu.ru/biology/en/>

Editor-in-Chief - Danil S. Vorobiev, Tomsk State University (Tomsk, Russia),

Co-Editor-in-Chief - Oleg S. Pokrovsky, National Centre for Scientific Research (Toulouse, France)

Associate Editor - Tatiana V. Raudina, Tomsk State University (Tomsk, Russia)

EDITORIAL COUNCIL

Danil S. Vorobiev - Editor-in-Chief, Tomsk State University, Tomsk, Russia

Oleg S. Pokrovsky - Co-Editor-in-Chief, National Centre for Scientific Research, Toulouse, France

Gleb N. Artemov - Editor, Tomsk State University, Tomsk, Russia

Olga G. Baranova - Editor, Komarov Botanical Institute, RAS, St. Petersburg, Russia

Maxim V. Bobrovsky - Editor, Institute of Physicochemical and Biological Problems in Soil Science, RAS, Pyshechino, Russia

Alexandra V. Volokitina - Editor, Forest Fire Science Laboratory, Sukachev Institute of Forest, Siberian Branch of the RAS, Krasnoyarsk, Russia

Sergei N. Goroshkevich - Editor, Institute of Monitoring of Climatic and Ecological Systems, SB RAS, Tomsk, Russia

Tatyana I. Gromovskiy - Editor, Moscow Polytechnic University, Moscow, Russia

Evgeny V. Denisov - Editor, Cancer Research Institute of Tomsk NRMC, Tomsk, Russia

Olga V. Dorogina - Editor, Central Siberian Botanical Garden SB RAS, Novosibirsk, Russia

Andrei A. Zverev - Editor, Tomsk State University, Tomsk, Russia

Yury V. Ivanov - Editor, Timiryazev Institute of Plant Physiology, RAS, Moscow, Russia

Svetlana A. Krivets - Editor, Institute of Monitoring of Climatic and Ecological Systems, SB RAS, Tomsk, Russia

Sergey P. Kulizhskiy - Editor, Tomsk State University, Tomsk, Russia

Sergey V. Loiko - Editor, Tomsk State University, Tomsk, Russia

Natalya M. Mineeva - Editor, Papanin Institute for Biology of Inland Waters, RAS, Borok, Russia

Anastasia V. Simakova - Editor, Tomsk State University, Tomsk, Russia

Vladimir V. Tarasov - Editor, Institute of Plant and Animal Ecology, RAS, Yekaterinburg, Russia

Yulia A. Frank - Editor, Tomsk State University, Tomsk, Russia

Boris I. Sheftel - Editor, AN Severtsov Institute of Ecology and Evolution, RAS, Moscow, Russia

Margarita V. Shternshis - Editor, All-Russian Research Institute of Biological Plant Protection, Krasnodar, Russia

Tatiana V. Raudina - Associate Editor, Tomsk State University, Tomsk, Russia,

e-mail: biotsu@mail.ru

EDITORIAL BOARD

Alexandrovskiy AL, Institute of Geography RAS (Moscow, Russia); **Ananjeva NB**, Zoological Institute RAS (St. Petersburg, Russia); **Aftanas LI**, State Research Institute of Physiology SB RAMS (Novosibirsk, Russia); **Vasil'eva ED**, Zoological Museum, MV Lomonosov Moscow State University (Moscow, Russia); **Dubois A**, French National Museum of Natural History (Paris, France); **Zeller B**, French National Institute for Agricultural Research (Nancy, France); **Zinchenko TD**, Institute of Ecology of the Volga River Basin RAS (Togliatti, Russia); **Kingma H**, Maastricht University (Maastricht, Netherlands); **Kryukov VY**, Institute of Systematics and Ecology of Animals SB RAS (Novosibirsk, Russia); **Kuznetsov VIV**, Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS (Moscow, Russia); **Lodygin ED**, Institute of Biology of Komi Scientific Centre UB RAS (Syktyvkar, Russia); **Lupashin VV**, University of Arkansas for Medical Sciences (Arkansas, USA); **Maximov TC**, Institute for Biological Problems of the Cryolithozone SB RAS (Yakutsk, Russia); **Nosov AM**, MV Lomonosov Moscow State University (Moscow, Russia); **Olennikov DN**, Institute of General and Experimental Biology SB RAS (Ulan-Ude, Russia); **Perdices A**, National Museum of Natural Sciences (Madrid, Spain); **Smirnova OV**, Center of Ecology and Productivity of Forests RAS (Moscow, Russia); **Sokolova YY**, Louisiana State University (Baton Rouge, Louisiana, USA); **Stepanov VA**, Research Institute of Medical Genetics SB RAMS (Tomsk, Russia); **Torchyk VI**, Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (Minsk, Republic of Belarus); **Sharakhov IV**, Virginia Polytechnic Institute and State University (Blacksburg, Virginia, USA)

PUBLISHER: TSU Press (Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation). Editor VG Lihacheva; Translator/Editor VV Vozdvizhenskij; camera-ready copy AI Leloyur; cover design LD Krivtsova.

Passed for printing 03.03.2025. Format 70×108¹/₁₆. Conventional printed sheets 15.7. Circulation is 50 copies. Orders No 6244. Open price. Date of publication 01.04.2025.

36 Lenin Ave, Tomsk, 634050, Russian Federation. Tel. +7 (382-2)-52-98-49. <http://publish.tsu.ru>.

E-mail: rio.tsu@mail.ru

СОДЕРЖАНИЕ

Артемов Г.Н. Обращение к читателю	8
---	---

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА

Бега А.Г., Логинов Д.Н., Гордеев М.И., Горячева И.И., Бородин Л.С., Ли Е.Ю., Москаев А.В. О расширении экологической ниши дупляного малярийного комара <i>Anopheles plumbeus</i> Stephens, 1828 на территории России и Белоруссии	9
Бочарова А.В., Степанов В.А. Поиск сигналов естественного отбора в локусах генома, ассоциированных с заболеваниями, приводящими к нарушениям когнитивных функций человека, в популяциях Северной Евразии	20
Вагайцева К.В., Колесников Н.А., Скалин М.Д., Валихова Л.В., Рузавина О.Д., Пестрецова Д.Е., Высочина А.Н., Харьков В.Н., Степанов В.А. Генетическое разнообразие популяций теленгитов и алтай-кижи по маркерам, используемым в ДНК-идентификации	29
Вассерлауф И.Э., Усов К.Е., Абылкасымова Г.М., Сибатаев А.К. Эволюционная реорганизация взаиморасположения хромосом в пространстве ядер трофоцитов у близкородственных видов дрозофил	38
Гавриленко М.М., Трифонова Е.А., Бабовская А.А., Зарубин А.А., Сваровская М.Г., Ижойкина Е.В., Степанов В.А. Подходы к анализу событий альтернативного сплайсинга в децидуальных клетках плаценты человека	48
Голубенко М.В. Современные представления об изменчивости митохондриального генома человека и ее роли в формировании фенотипа	58
Гончаров Н.П., Плотников К.О., Чепурнов Г.Ю., Каменев И.А., Немцев Б.Ф., Смоленская С.Э., Блинов А.Г. Глобальное потепление и генетика типа и скорости развития пшениц	68
Дронова Т.А., Бабышкина Н.Н., Вторушин С.В., Чердынцева Н.В. Роль TGF- β 1/P13K/Akt опосредованного сигнального пути в прогрессировании эстроген-позитивного рака молочной железы	76
Жалсанова И.Ж., Фонова Е.А., Валиахметов Н.Р., Государкина С.Н., Петлина Е.Ю., Сеитова Г.Н., Степанов В.А., Скрябин Н.А. Клинический случай: новый вариант в сайте сплайсинга гена <i>SPAST</i> при аутосомно-доминантной спастической параплегии 4-го типа	83
Зуев А.С., Шевцов Д.Г., Васильева О.Ю., Деменева В.В., Саженова Е.А., Толмачева Е.Н., Никитина Т.В., Васильев С.А. Сравнительный анализ аномалий метилома хориона при различных патологиях беременности	93
Малахова А.А., Аллаярова Э.Р., Шарипова Д.В., Павлова С.В., Григорьева Е.В., Медведев С.П., Закиян С.М. Моделирование нейродегенеративных заболеваний, вызванных протеинопатией, на культурах клеток человека	103
Медведев С.П., Ахмерова В.И., Надточий Ю.А., Григорьева Е.В., Павлова С.В., Закиян С.М. Направленное редактирование геномов индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека как инструмент функционального анализа генетических вариантов	113
Невская К.В., Ефимова Л.В., Козлова П.К., Першина А.Г., Удуд Е.В. Получение гетероклеточных сфероидов для моделирования метастазов в печени	122

Никиткина Э.Г., Луцаева И.В., Колесниченко Л.Г. Метаболическая активность гетеротрофных микробных сообществ пойменных озёр среднего течения реки Оби	130
Островерхова Н.В. Генетические исследования медоносной пчелы <i>Apis mellifera</i> L. в Томском государственном университете	139
Пшеничникова Т.А., Смирнова О.Г. Селекционный эффект интрогрессии в хромосому 5D мягкой пшеницы (<i>Triticum aestivum</i> L.) от вида <i>Aegilops tauschii</i> Coss.	147
Симонов А.В., Гордеева Е.И., Осипова С.В., Васенина Л.Ю., Ли В., Пшеничникова Т.А. Влияние хромосомы 4Th пырея с геном опушения <i>H11th</i> в геноме замещённых линий мягкой пшеницы на адаптацию к засухе	153
Харьков В.Н., Валихова Л.В., Лузина Ф.А., Степанов В.А. Генетический ландшафт народов Алтая по гаплогруппам Y-хромосомы	162
Шарахов И.В., Шарахова М.В. Томская школа эволюционной цитогенетики малярийных комаров	170
Шевченко А.И., Арссан А.М., Захарова И.С. На пути к созданию надёжных линий наивных плюрипотентных клеток человека	184

TABLE OF CONTENTS

Artemov GN. Addressing the reader	8
---	---

CELL BIOLOGY AND GENETICS

Bega AG, Loginov DN, Gordeev MI, Goryacheva II, Borodin LS, Lee EY, Moskaev AV. On the expansion of the ecological niche of the hollow malaria mosquito <i>Anopheles plumbeus</i> Stephens, 1828 in Russia and Belarus	9
Bocharova AV, Stepanov VA. Search for signals of natural selection in genomic loci associated with diseases leading to impairments of human cognitive functions in Northern Eurasia populations	20
Vagaytseva KV, Kolesnikov NA, Skalin MD, Velikova LV, Ruzavina OD, Pestretsovo DE, Vysochina AN, Kharkov VN, Stepanov VA. Genetic diversity of Telengite and Altai-kizhi populations by markers used in forensic genetics	29
Wasserlauf IE, Usov KE, Abylkasymova GM, Sibataev AK. Evolutionary reorganization of chromosome interposition in the space of trophocyte nuclei in closely related <i>Drosophila</i> species	38
Gavrilenko MM, Trifonova EA, Babovskaya AA, Zarubin AA, Swarovskaya MG, Izhoikina EV, Stepanov VA. Approaches to the analysis of alternative splicing events in human placental decidual cells	48
Golubenko MV. Modern concepts of the human mitochondrial genome variability and its role in the shaping of phenotype	58
Goncharov NP, Plotnikov KO, Chepurinov GY, Kamenev IA, Nemtsev BF, Smolenskaya SE, Blinov AG. Global warming and the genetics of wheat type and rate of development	68
Dronova TA, Babyshkina NN, Vtorushin SV, Cherdyntseva NV. The role of the TGF- β 1/PI3K/Akt mediated signaling pathway in the progression of estrogen-positive breast cancer	76
Zhalsanova IZh, Fonova EA, Valiakhmetov NR, Gosudarkina SN, Petlina EYu, Seitova GN, Stepanov VA, Skryabin NA. Case report: a novel splice variant of <i>SPAST</i> gene in autosomal dominant spastic paraplegia type 4	83
Zuev AS, Shevtsov DG, Vasilyeva OYu, Demeneva VV, Sazhenova EA, Tolmacheva EN, Nikitina TV, Vasilyev SA. Comparative analysis of chorionic methylation abnormalities in different pregnancy pathologies	93
Malakhova AA, Allayarova ER, Sharipova DV, Pavlova SV, Grigor'eva EV, Medvedev SP, Zakian SM. In vitro models of proteinopathy-associated neurodegenerative diseases	103
Medvedev SP, Akhmerova VI, Nadtochy JA, Grigor'eva EV, Pavlova SV, Zakian SM. Targeted editing of human induced pluripotent stem cells genomes as a tool for functional analysis of genetic variants	113
Nevskaya KV, Efimova LV, Kozlova PK, Pershina AG, Udut EV. Heterocellular spheroids as a model of liver metastasis	122
Nikitkina EG, Luschaeva IV, Kolesnichenko LG. Metabolic activity of heterotrophic microbial communities of floodplain lakes in the middle reaches of the Ob River	130
Ostroverkhova NV. Genetic research of the honey bee <i>Apis mellifera</i> L. at Tomsk State University	139

Pshenichnikova TA, Smirnova OG. Breeding effect of introgression into chromosome 5D of common wheat (<i>Triticum aestivum</i> L.) from the species <i>Aegilops tauschii</i> Coss.	147
Simonov AV, Gordeeva EI, Osipova SV, Vassenina LY, Li W, Pshenichnikova TA. The effect of the 4Th chromosome of wheatgrass with the leaf hairiness gene <i>H11th</i> in the genome of substituted lines of common wheat on adaptation to drought	153
Kharkov VN, Valikhova LV, Luzina FA, Stepanov VA. Genetic landscape of the Altai peoples by Y-chromosome haplogroups	162
Sharakhov IV, Sharakhova MV. Tomsk school of evolutionary cytogenetics of malaria mosquitoes	170
Shevchenko AI, Arssan AM, Zakharova IS. Towards the generation of safe naïve human pluripotent cell lines	184

Научная статья

doi: 10.17223/19988591/69/1

Уважаемые коллеги, читатели и авторы!

В 2024 году исполнилось 60 лет со дня восстановления кафедры цитологии и генетики Томского государственного университета, которая сегодня именуется кафедрой генетики и клеточной биологии. Биологическая наука имеет длинную историю, но ни одно научное направление в XX веке не испытывало так много потрясений, как молодая наука – генетика. Российская мысль привнесла значительный вклад в развитие наук о наследственности, о клетке, особенно значимый в первой половине прошлого века: достаточно вспомнить таких ученых с мировым именем, как Н.И. Вавилов, Н.К. Колцов, А.С. Серебровский, С.С. Четвериков и многие другие. В 1931 году в первом сибирском университете открывается первая за Уралом и, в течение ряда лет, единственная кафедра селекции, цитологии и генетики растений под руководством Владимира Петровича Чехова (1898–1937). Основные направления работы кафедры в то время были связаны с изучением кариологии, интродукции и селекции цветковых, и, прежде всего, ценных для сельского хозяйства растений. Эти работы имели большое значение для советской и мировой науки, аграрного производства страны, однако вскоре после печально знаменитой сессии ВАСХНИЛ в августе 1948 года научные исследования и обучение студентов на кафедре были приостановлены, а сама кафедра закрыта.

Восстановление кафедры произошло благодаря усилиям Надежды Николаевны Карташовой (1907–1998), ученицы В.П. Чехова, которая, будучи доцентом кафедры ботаники, продолжала обучать студентов законам генетики, несмотря на резкую критику науки на факультете. С 1 сентября 1964 года кафедра продолжила свою работу и не остановила ее ни на один день. Основными направлениями деятельности являются цитогенетика растений и животных, микробиология, а в последнее время – геномика, инженерная биология и биотехнология.

Выпуск № 69 журнала «Вестник Томского государственного университета. Биология» посвящен 60-летию кафедры генетики и клеточной биологии Томского государственного университета. Представленные материалы освещают широкий круг вопросов в области медицинской генетики, генетики растений, насекомых, человека, а также клеточной биологии и микробиологии.

Г.Н. Артемов,

и. о. заведующего кафедрой генетики и клеточной биологии,
доцент, канд. биол. наук

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА

Научная статья

УДК 574.3, 575.2

doi: 10.17223/19988591/69/2

О расширении экологической ниши дупляного малярийного комара *Anopheles plumbeus* Stephens, 1828 на территории России и Белоруссии

Бега Анна Геннадьевна¹, Логинов Денис Николаевич²,
Гордеев Михаил Иванович³, Горячева Ирина Игоревна⁴,
Бородин Лев Сергеевич⁵, Ли Елизавета Юрьевна⁶,
Москаев Антон Вячеславович⁷

^{1, 3, 4, 5, 6, 7} Государственный университет просвещения, Москва, Россия

^{1, 4} Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

² Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по биоресурсам,
Минск, Республика Беларусь

^{3, 7} Российский государственный университет народного хозяйства
имени В.И. Вернадского, Балашиха, Россия

¹ <https://orcid.org/0000-0002-0011-7642>, anni.miya@gmail.com

² <https://orcid.org/0009-0000-8148-0314>, kavax@yandex.by

³ <https://orcid.org/0000-0001-9031-6655>, gordeev_mikhail@mail.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0003-1913-5987>, iigoryacheva@mail.ru

⁵ <https://orcid.org/0009-0009-2743-8620>, lev.borodin2016@yandex.ru

⁶ <https://orcid.org/0009-0004-7748-0767>, lilizavetau@mail.ru

⁷ <https://orcid.org/0000-0003-0592-3691>, anton-moskaev@yandex.ru

Аннотация. *Anopheles plumbeus* – единственный в Европе вид, способный передавать возбудителя наиболее смертоносной тропической малярии. До недавнего времени он считался видом, редко нападающим на человека, приуроченным к широколиственным лесам и не образующим популяций с высокой плотностью. Целью настоящей работы было изучение изменения экологических предпочтений и географического распространения дупляного малярийного комара на территории России и Белоруссии. Сборы комаров проводили с 2017 по 2024 г. в природных и антропогенных местообитаниях. Видовую идентификацию проводили морфологическим и молекулярно-генетическим методами. Разработаны праймеры на фрагменты последовательности *ITS2* рибосомной ДНК и BOLD-фрагменты митохондриального гена *cox1* для идентификации *An. plumbeus*. Было показано, что в настоящий момент *An. plumbeus* расширил свою экологическую нишу. Кроме типичных мест выплода вида, дупел, пней и развилки деревьев, самки комаров стали откладывать яйца в ёмкости антропогенного происхождения: автомобильные покрышки, вазоны и т.п. Это позволило виду распространиться за пределы нативного ареала, ограниченного ранее широколиственными лесами, и сильно повысить численность. *An. plumbeus* был найден на Черноморском побережье Кавказа на урбанизированных территориях, от границы Абхазии с Грузией до г. Джубга, а также в парке г. Могилева Республики Беларусь. Было установлено, что самки *An. plumbeus* стали нападать на человека. Данные об экологических предпочтениях и статусе вида как потенциального переносчика малярии требуют пересмотра и внимания противоэпидемиологических служб.

Ключевые слова: синантропизация, экологические ниши, *Anopheles plumbeus*, *ITS2*, *cox1*, ареал, переносчики малярии

Источник финансирования: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (РНФ) № 24-44-10003, <https://rscf.ru/project/24-44-10003/> «Генетический и экологический анализ популяций малярийного комара *Anopheles plumbeus* как важного потенциального переносчика трансмиссивных заболеваний в Российской Федерации и Республики Беларусь» (проект реализуется научным коллективом совместно с зарубежным научным коллективом, отобранным Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований (БРФФИ), грант № Б23РНФМ-068).

Для цитирования: Бега А.Г., Логинов Д.Н., Гордеев М.И., Горячева И.И., Бородин Л.С., Ли Е.Ю., Москаев А.В. О расширении экологической ниши дупляного малярийного комара *Anopheles plumbeus* Stephens, 1828 на территории России и Белоруссии // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2025. № 69. С. 9–19. doi: 10.17223/19988591/69/2

Original article

doi: 10.17223/19988591/69/2

On the expansion of the ecological niche of the hollow malaria mosquito *Anopheles plumbeus* Stephens, 1828 in Russia and Belarus

Anna G. Bega¹, Denis N. Loginov², Mikhail I. Gordeev³, Irina I. Goryacheva⁴, Lev S. Borodin⁵, Elizaveta Y. Lee⁶, Anton V. Moskaev⁷

^{1, 3, 4, 5, 6, 7} Federal State University of Education, Moscow, Russian Federation

^{1, 4} Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

² Scientific and Practical Centre of the National Academy of Sciences of Belarus on Bioresources, Minsk, Republic of Belarus

⁷ Vernadsky Russian State University of National Economy, Balashihi, Russian Federation

¹ <https://orcid.org/0000-0002-0011-7642>, anni.miya@gmail.com

² <https://orcid.org/0009-0000-8148-0314>, kavax@yandex.by

³ <https://orcid.org/0000-0001-9031-6655>, gordeev_mikhail@mail.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0003-1913-5987>, iigoryacheva@mail.ru

⁵ <https://orcid.org/0009-0009-2743-8620>, lev.borodin2016@yandex.ru

⁶ <https://orcid.org/0009-0004-7748-0767>, lilizavetau@mail.ru

⁷ <https://orcid.org/0000-0003-0592-3691>, anton-moskaev@yandex.ru

Summary. The malaria mosquito, *Anopheles plumbeus* Stephens, 1828, is the only species in Europe, capable of transmitting the pathogen of the most deadly tropical malaria. Until recently, it was considered a species that rarely attacks humans, is confined to broad-leaved forests and does not form high-density populations. The aim of the present work was to study changes in the ecological preferences and geographical distribution of *An. plumbeus* in Russia and Belarus. Our team studied breeding sites and collected *An. plumbeus* in natural and anthropogenic habitats between 2017 and 2024. Species affiliation was determined by morphological parameters, using standard keys. A part of randomly selected individuals from each sample was subjected to molecular genetic analysis. We obtained fragments of *ITS2* ribosomal DNA sequence and BOLD-fragments of mitochondrial gene *cox1*. We developed primers for molecular genetic identification of *An. plumbeus* using the Primer3 programme (<https://primer3.ut.ee/>). *ITS2* sequence fragments of *An. plumbeus* ribosomal DNA

were obtained from primers of 5,8S (5'-TGTGAACTGCAGGACACAT-3') and 28S (5'-ATGCTTAAATTTAGGGGGTA-3'). BOLD fragments of the mitochondrial *cox1* gene of *An. plumbeus* were obtained using our designed primers An.pl_F (5'-TTTCAACAAA TCATAAGGATATTGG-3') and An.pl_R (5'-TATACTTCTGGGTGTCCAAAA AATCA-3'). Until 2019, we found *An. plumbeus* larvae only in natural brood sites such as fallen large leaves, old stumps, forks and tree hollows. Starting from 2019, we started to find *An. plumbeus* larvae in urbanized areas. The number of detected brood sites in anthropogenic habitats increased from year to year: in 2019, 1; 2020, 6; 2021, 14. - 6; 2021 - 14; 2024 - 50. Some populations of *An. plumbeus* have retained their predilection for laying eggs in tree hollows in urban parks and alleys. Other populations in urbanised areas began to lay eggs only in containers of anthropogenic origin. In 2024, as a result of an expedition, we confirmed the presence of *An. plumbeus* in the Republic of Belarus. *An. plumbeus* larvae were found in a car tyre in the city park in Mogilev on the border of broad-leaved forest. Together with changes in preferences for choosing egg-laying sites, we observe changes in behavioural preferences for selecting a feeder. In 2020 and 2021, we captured 2 and 4 adults of *An. plumbeus* on our own during 30 minutes of counting, respectively. All captured adults swarmed without attack. In a similar survey in 2024, we captured 8 adults, including 5 attacking females and 3 males. We believe that the observed transition to synanthropic existence of *An. plumbeus* mosquitoes may be a prerequisite for the formation of potentially invasive populations in the future. By transitioning to synanthropic existence, the population gets rid of a number of biotopic constraints that determine its range. Previously, the range of *An. plumbeus* was highly fragmented due to its attachment to humid broadleaved forests. The limited number of larval habitats, low humidity and seasonal irregularity of precipitation may have acted as factors limiting the population size of this species. The large number of potential breeding sites for *An. plumbeus* clutches, high humidity in many areas where irrigation systems are developed, and the presence of a large number of people as potential feeders are present in urbanised environments. Synanthropisation has allowed the species to expand its ecological niche, spread beyond its native range, which was previously restricted to broadleaved forests, and greatly increase its numbers. The observed transformation of the ecological niche of *An. plumbeus* is similar to the changes that occurred in a number of mosquito species of the genus *Aedes* of the subgenus *Stegomyia*. We believe that synanthropization involves a sustained change in biotopic preferences that presumably has a genetic basis. The data obtained on the ecological preferences of *An. plumbeus* require reconsideration of the status of the species as a potential vector of tropical malaria and attention of anti-epidemiological services to this species.

The article contains 13 References.

Keywords: synanthropization, ecological niches, *Anopheles plumbeus*, *ITS2*, *cox1*, range, malaria vectors

Fundings: The study was funded by the Russian Science Foundation grant (RSF) No. 24-44-10003, <https://rscf.ru/en/project/24-44-10003/> "Genetic and ecological analysis of populations of the malaria mosquito *Anopheles plumbeus* as an important potential vector of vector-borne diseases in the Russian Federation and the Republic of Belarus" (the project is implemented by a scientific team together with a foreign scientific team selected by the Belarusian Republican Foundation for Basic Research (BRFBR), grant No. B23RNFМ-068).

For citation: Bega AG, Loginov DN, Gordeev MI, Goryacheva II, Borodin LS, Lee EY, Moskaev AV. On the expansion of the ecological niche of the hollow malaria mosquito *Anopheles plumbeus* Stephens, 1828 in Russia and Belarus. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya* = *Tomsk State University Journal of Biology*. 2025;69:9-19. doi: 10.17223/19988591/69/2

Введение

Из всех видов малярийных комаров рода *Anopheles* (Diptera, Culicidae), встречающихся на территории Европы, дупляной малярийный комар *An. plumbeus* Stephens, 1828 – единственный вид, способный передавать возбудителя наиболее смертоносной тропической малярии *Plasmodium falciparum* William H. Welch, 1897 [1, 2]. Согласно имеющимся данным, *An. plumbeus* способен также экстенсивно передавать *Pl. falciparum*, как один из наиболее эффективных африканских переносчиков тропической малярии *An. gambiae*, Giles, 1902 [3].

An. plumbeus до недавнего времени считался лесным видом, выплаживающимся в дуплах широколиственных деревьев и питающимся на широком круге диких животных. В связи с приуроченностью к специфическим биотопам ареал вида был фрагментарен, а популяции имели низкую плотность, в силу чего этот вид имел статус второстепенного переносчика малярии.

An. plumbeus обитает на юге европейской части России. В течение XX в. данный вид обнаруживали на территории Краснодарского края, Ростовской области, Ставропольского края, Республики Адыгея, Республики Дагестан и Республики Крым [4]. Кроме того, до 1967 г. единичные находки *An. plumbeus* совершались в Нижнем Поволжье – на территории Волгоградской и Астраханской областей [5]. В Республике Беларусь *An. plumbeus* длительное время считался исчезнувшим видом. Последние его находки датировались 70-ми и 80-ми годами [6, 7]. В 2022 г. было обнаружено 2 особи имаго этого вида в парке г. Могилёва [8].

Целью настоящей работы было изучение изменения экологических предпочтений и географического распространения дупляного малярийного комара *Anopheles plumbeus* Stephens, 1828 на территории России и Белоруссии.

Материалы и методы

В период с 2017 по 2024 г. проводились мониторинговые исследования географического распространения и мест выплода *An. plumbeus* в природных и антропогенных местообитаниях. Видовую принадлежность определяли по морфологическим признакам, по стандартным ключам [9]. Часть особей, отобранных случайно, из каждой выборки подвергали молекулярно-генетическому анализу. Мы получали фрагменты последовательности *ITS2* рибосомной ДНК и BOLD-фрагменты митохондриального гена *cox1*. Для выделения тотальной ДНК каждую особь извлекали из спирта, просушивали и гомогенизировали в лизирующем растворе с протеиназой К. Тотальную ДНК выделяли фенол-хлороформным методом. Концентрацию ДНК в препаратах выравнивали до 30 нг/мкл. ПЦР проводили в конечном объеме 20 мкл с использованием наборов для амплификации «EncycloPlus PCR kit» (Евроген, Россия) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Нами были разработаны праймеры с использованием программы Primer3 (<https://primer3.ut.ee/>). Фрагменты последовательности *ITS2* рибосомной ДНК были получены с праймеров 5,8S (5'-TGTGAACTGCAGGACACAT-3')

и 28S (5'-ATGCTTAAATTTAGGGGGTA-3'). Ожидаемая длина фрагмента 436 п.н. BOLD-фрагменты митохондриального гена *cox1* получены с помощью праймеров, разработанных нами на основе последовательности GenBank: MG560164: An.pl_F (5'-TTTCAACAAATCATAAGGATATTGG-3') и An.pl_R (5'-TATACTTCTGGGTGTCCAAAAAATCA-3'). Ожидаемая длина фрагмента 658 п.н. Фрагменты, полученные в результате амплификации, очищали в 1,5%-ном агарозном геле. Элюция фрагментов из геля проводилась с использованием набора для элюции Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, США) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Полученные фрагменты секвенировали по Сенгеру.

Результаты исследования и обсуждение

До 2019 г. личинок *An. plumbeus* находили исключительно в природных местах выплода, таких как опавшие крупные листья, старые пни, развилки и дупла деревьев. В 2019 г. мы обнаружили личинок *An. plumbeus* в единственном антропогенном микробиотопе – автомобильной крышке, в окрестностях г. Адлера. В 2020 г. *An. plumbeus* был встречен нами в 6 антропогенных биотопах, на территории от г. Адлера до пос. Зубова щель (территория в 60 км вдоль Черноморского побережья). В выборках западнее пос. Зубова щель личинки *An. plumbeus* в ёмкостях антропогенного происхождения отсутствовали. В 2021 г. нами было обнаружено уже 14 мест выплода. Выявлено продвижение на запад до г. Туапсе (расширение на 45 км) и восток до восточной границы Абхазии (расширение на 45 км). Таким образом, мы можем констатировать тенденцию к синантропизации этого вида на Черноморском побережье Кавказа. Нами описаны как популяции, занявшие урбанизированные территории, но сохраняющие приуроченность к древесным растениям (городские парки и аллеи), так и популяции в сельской местности, полностью отказавшиеся от кладки яиц в дупла в пользу емкостей антропогенного происхождения. Мы предполагаем, что наблюдаем в данный момент активное расширение экологической ниши *An. plumbeus* с синантропизацией и освоением урбанизированных территорий. В условиях синантропизации растут численность и частота встречаемости комаров данного вида в регионе. Так, в 2024 г. нами было обнаружено более 50 антропогенных микробиотопов *An. plumbeus* на территории от г. Адлера до г. Дзубга (расширение на 40 км).

В 2024 г. в результате экспедиции нами было подтверждено наличие *An. plumbeus* в Республике Беларусь. Впервые был обнаружен личиночный биотоп в парке г. Могилёва, в 100 м от городского пляжа. Личинки развивались в автомобильной крышке, заполненной дождевой водой. Данный микробиотоп находился на границе широколиственного леса и урбанизированной территории.

В результате секвенирования мы установили, что выбранные нами локусы у *An. plumbeus* высоко консервативны. У всех проанализированных нами особей был один гаплотип ITS2 (GenBank ID PQ776784–PQ776790).

Для BOLD-фрагмента COI было выявлено два гаплотипа с отличием в один нуклеотид. Замена молчащая (GenBank ID PQ740506–PQ740512).

Интересно отметить, что при отлове имаго на себе в 2020 и 2021 гг. нами было отловлено 2 и 4 особи имаго *An. plumbeus* соответственно за 30 мин учёта. Все отловленные имаго роились без нападения. При аналогичном учёте в 2024 г. нами было отловлено 8 имаго, среди которых 5 нападавших самок и 3 самца. Возможно, вместе с изменением предпочтений к выбору мест для откладки яиц мы наблюдаем изменения предпочтений при выборе прокормителя. Похожая тенденция наблюдается в Европе: *An. plumbeus* откладывает яйца в дупла деревьев в городских парках и садах. В Бельгии был выявлен взрывной рост численности *An. plumbeus*, который можно объяснить сменой данным видом предпочтительного места для размножения с дупел деревьев на выгребные ямы и емкости для компостирования отходов сельского хозяйства [2]. Освоение урбанизированных местообитаний совпало с общим расширением ареала данного вида в Европе. В 2017 г. *An. plumbeus* впервые был обнаружен в Галисии (Испания), в 2021 г. – в Салониках (Греция) [10, 11]. Расширение ареала *An. plumbeus* и увеличение привлекательности урбанизированных территорий для этого вида отмечены в Германии в период с 2010 по 2014 г. [12]. Также было показано, что самки в некоторых европейских популяциях стали предпочитать нападать на человека [1].

Мы считаем, что такой переход к синантропному существованию комаров может являться предпосылкой к образованию в будущем потенциально инвазионных популяций. Переходя к синантропному существованию, популяция избавляется от ряда биотопических ограничений, определяющих её ареал. Так, ареал *An. plumbeus* был сильно фрагментирован из-за привязки к влажным широколиственным лесам. Ограниченное количество личиночных биотопов, низкая влажность и сезонная неравномерность осадков могли выступать факторами, лимитирующими численность популяций этого вида. В урбанизированной среде имеется большое количество потенциальных ёмкостей для кладок *An. plumbeus*, на многих территориях имеются системы орошения, присутствует большое число людей – потенциальных прокормителей. В настоящий момент, кроме типичных мест выплода – дупел, пней и развилок деревьев, самки комаров стали откладывать яйца в ёмкости антропогенного происхождения – автомобильные покрышки, вазоны, черные пластиковые пакеты и резиновые фрагменты в скоплениях мусора.

Интересно отметить, что наблюдаемая нами трансформация экологической ниши *An. plumbeus* аналогична изменениям, которые произошли у ряда видов комаров рода *Aedes* подрода *Stegomyia*. Так, инвазионные виды *Ae. albopictus* Skuse, 1895, и *Ae. aegypti* L., 1762 тоже изначально являлись лесными видами и занимали экологическую нишу, сходную с *An. plumbeus*. Они также откладывают яйца на стенки древесных дупел или опавшие листья, их яйца способны выдерживать длительное пересыхание, самки имеют широкий круг прокормителей, нападали в течение всего светового дня. За последние 50 лет оба вида перешли к откладке яиц в ёмкости антропогенного происхождения, а затем распространились по всем континентам.

Стоит отметить, что для лесных нативных популяций *An. plumbeus* было показано, что в засушливые периоды самки способны откладывать яйца в различные антропогенные резервуары, заполненные водой. Однако при этом комары не распространяются за пределы лесных местообитаний, а при появлении доступных естественных мест выплода всегда предпочитают природные биотопы. По нашему мнению, такое вынужденное изменение поведения при откладке яиц не является свидетельством необратимой синантропизации. Мы считаем, что синантропизация предполагает устойчивое изменение биотопических предпочтений, которое, предположительно, имеет генетическую основу.

У *An. plumbeus* имеются политенные хромосомы в слюнных железах личинок, в питающих клетках ооцитов яичников и в мальпигиевых сосудах имаго. В настоящий момент для этого вида нет опубликованной цитогенетической карты, лишь описаны параметры кариотипа [13]. При окрашивании хромосом выявлено, что локализация С-позитивного гетерохроматина у *An. plumbeus* значительно меняется от особи к особи. Нами было замечено, что у данного вида имеются парацентрические хромосомные перестройки, требующие дополнительного изучения.

Заключение

Нами установлено расширение экологической ниши *An. plumbeus*. Кроме типичных мест выплода вида, дупел, пней и развилок деревьев, самки комаров стали откладывать яйца в ёмкости антропогенного происхождения: автомобильные покрышки, вазоны и т.п. Это позволило виду увеличить численность и распространиться за пределы нативного ареала, ограниченного ранее широколиственными лесами. *An. plumbeus* был найден нами на урбанизированных территориях Черноморского побережья Кавказа, от границы Абхазии с Грузией до г. Дзубга, а также в парке г. Могилёва Республики Беларусь. Таким образом, данные об экологических предпочтениях и статусе вида как потенциального переносчика малярии требуют пересмотра и внимания противоэпидемиологических служб.

Список источников

1. Bueno-Marí R., Jiménez-Peydró R. *Anopheles plumbeus* Stephens, 1828: a neglected malaria vector in Europe // *Malaria Reports*. 2011. Vol. 1:e2. PP. 2–6. doi: 10.4081/malaria.2011.e2
2. Dekoninck W., Hendrickx F., Van Bortel W., Versteirt V., Coosemans M., Damiens D., Hance T., De Clercq E.M., Hendrickx G., Schaffner F., Grootaert P. Human-induced expanded distribution of *Anopheles plumbeus*, experimental vector of West Nile virus and a potential vector of human malaria in Belgium // *Journal of medical entomology*. 2011. Vol. 48, № 4. PP. 924–928. doi: 10.1603/me10235
3. Schaffner F., Thiéry I., Kaufmann C., Zettor A., Lengeler C., Mathis A., Bourguoin C. *Anopheles plumbeus* (Diptera: Culicidae) in Europe: a mere nuisance mosquito or potential malaria vector? // *Malaria journal*. 2012. Vol. 11. PP. 1–7. doi: 10.1186/1475-2875-11-393
4. Горностаева Р.М., Данилов А.В. Об ареалах малярийных комаров (Diptera, Culicidae: *Anopheles*), не входящих в комплекс *maculipennis*, на территории России // *Паразитология*. 2001. Т. 35, № 5. С. 394–405.

5. Горностаева Р.М. Анализ современных данных о фауне и ареалах малярийных комаров (Diptera: Culicidae: *Anopheles*) на территории России // Паразитология. 2003. Т. 37, № 4. С. 298–305.
6. Катайцева Т.В. К фауне и экологии кровососущих комаров Беловежской пуши Брестской области // V съезд гигиенистов, эпидемиологов и инфекционистов Белоруссии : тез. докл. Белорус. об-ва эпидемиологов микробиологов и инфекционистов. Минск, 1971. С. 412–413.
7. Савицкий Б.П. Кровососущие комары Гомельской области // Животный мир Белорусского Полесья, охрана и рациональное использование : обл. науч.-практ. конф. УНПО «Фауна Полесья» : тез. докл. Гомель, 1982. С. 13–18.
8. Бычкова Е.И., Якович М.М., Сусли Д.С., Довнар Д.В. Кровососущие членистоногие (Acari: Ixodidae; Diptera: Culicidae, Simuliidae) в населенных пунктах различной категории Могилевской области Беларуси // Ученые записки УО ВГАВМ. 2023. Т. 59, № 2. С. 124–129.
9. Гуцевич В.А., Мончадский А.С., Штакельберг А.А. Насекомые двукрылые. Комары (семейство Culicidae) // Фауна СССР. Л. : Наука. 1970. Т. 3, вып. 4. 384 с.
10. Martínez-Barciela Y., Martínez J.M.P., Torres M.I.S., Ortega Á.P., González J.C.O., González J.G. First records of *Anopheles* (*Anopheles*) *plumbeus* Stephens, 1828 and *Culex* (*Culex*) *torrentium* Martini, 1925 (Diptera: Culicidae) in Galicia (NW Spain) // Journal of Vector Ecology. 2020. Vol. 45, № 2. PP. 306–311. doi: 10.1111/jvec.12401
11. Spanoudis C.G., Pappas C.S., Savopoulou-Soultani M., Andreadis S.S. Composition, seasonal abundance, and public health importance of mosquito species in the regional unit of Thessaloniki, Northern Greece // Parasitology Research. 2021. Vol. 120, № 9. PP. 3083–3090. doi: 10.1007/s00436-021-07264-y
12. Heym E.C., Kampen H., Fahle M., Hohenbrink T.L., Schäfer M., Scheuch D.E., Walther D. *Anopheles plumbeus* (Diptera: Culicidae) in Germany: updated geographic distribution and public health impact of a nuisance and vector mosquito // Tropical Medicine & International Health. 2017. Vol. 22, № 1. PP. 103–112. doi: 10.1111/tmi.12805
13. Pili E., Marchi A. Chromosome evolution in treehole breeding *Anopheles* (Diptera, Culicidae) // Italian Journal of Zoology. 1999. Vol. 66, № 1. PP. 33–37.

References

1. Bueno-Marí R, Jiménez-Peydró R. *Anopheles plumbeus* Stephens, 1828: a neglected malaria vector in Europe. *Malaria Reports*. 2011;1:e2:2-6. doi: 10.4081/malaria.2011.e2
2. Dekoninck W, Hendrickx F, Van Bortel W, Versteirt V, Coosemans M, Damiens D, Hance T, De Clercq EM, Hendrickx G, Schaffner F, Grootaert P. Human-induced expanded distribution of *Anopheles plumbeus*, experimental vector of West Nile virus and a potential vector of human malaria in Belgium. *Journal of medical entomology*. 2011;48(4):924-928. doi: 10.1603/me10235
3. Schaffner F, Thiéry I, Kaufmann C, Zettor A, Lengeler C, Mathis A, Bourgouin C. *Anopheles plumbeus* (Diptera: Culicidae) in Europe: a mere nuisance mosquito or potential malaria vector? *Malaria journal*. 2012;26(11):393. doi: 10.1186/1475-2875-11-393
4. Gornostaeva RM, Danilov AV. Ob arealah malyariinih komarov (Diptera, Culicidae: *Anopheles*), ne vkhodyaschih v kompleks maculipennis na territorii Rossii [On the ranges of malarial mosquitoes (Diptera, Culicidae: *Anopheles*), not included in the maculipennis complex, on the territory of Russia]. *Parasitology*. 2001;35(5):394-405. In Russian
5. Gornostaeva RM. Analiz sovremennih dannih o faune i arealah malyariinih komarov (Diptera : Culicidae: *Anopheles*) na territorii Rossii [Analysis of modern data on the fauna and ranges of malarial mosquitoes (Diptera: Culicidae: *Anopheles*) in Russia]. *Parasitology*. 2003;37:4:298-305. In Russian
6. Kataytseva TV. K faune i ekologii krovososuschihi komarov Belovezhskoi puschi Brestskoi oblasti [To the fauna and ecology of blood-sucking mosquitoes of Belovezhskaya Pushcha of Brest region]. In: *V s"ezd gigenistov, epidemiologov i infekcionistov Belorussii. tez. dokl.*

- Tezisy докладov Belarus. ob-vo epidemiologov mikrobiologov i infekcionistov [V Congress of hygienists, epidemiologists and infectious disease specialists of Belorussia]. Minsk: Belorussian Society of Epidemiologists, Microbiologists and Infectious Diseases; 1971. pp. 412-413. In Russian
7. Savitsky BP. Krovososuschie komari Gomelskoi oblasti [Blood-sucking mosquitoes of Gomel region]. In: *Zhivotnyj mir Belorusskogo Poles'ya, ohrana i racional'noe ispol'zovanie*. Materialy nauch. konf. [Animal world of Belorussian Polesie, protection and rational use. Proc. of the Sci. Conf.]. Gomel: Gomel State University; 1982. pp. 13-18. In Russian
 8. Bychkova EI, Yakovich MM, Suslo DS, Dovnar DV. Krovososuschie chlenistonogie (Acari: Ixodidae; Diptera: Culicidae, Simuliidae) v naselennih punktah razlichnoi kategorii Mogilevskoi oblasti Belarusi [Blood-sucking arthropods (Asagi: Ixodidae; Diptera: Culicidae, Simuliidae) in settlements of different categories of the Mogilev region of Belarus]. *Scientific Notes of the UO VGAVM*. 2023;59(2):124-129. In Russian
 9. Gutsevich VA, Monchadsky AS, Stakelberg AA. Nasekomiye dvukrilie. Komari (semeistvo Culicidae) [Insects of two-winged species. Mosquitoes (family Culicidae)]. In: *Fauna SSSR [Fauna of the USSR]*. L.: Science; 1970. Vol. 9 (4). 384 p. In Russian
 10. Martínez-Barciela Y, Martínez JMP, Torres MIS, Ortega AP, González JCO, González JG. First records of *Anopheles (Anopheles) plumbeus* Stephens, 1828 and *Culex (Culex) torrentium* Martini, 1925 (Diptera: Culicidae) in Galicia (NW Spain). *Journal of Vector Ecology*. 2020;45(2):306-311. doi: 10.1111/jvec.12401
 11. Spanoudis CG, Pappas CS, Savopoulou-Soultani M, Andreadis SS. Composition, seasonal abundance, and public health importance of mosquito species in the regional unit of Thessaloniki, Northern Greece. *Parasitology Research*. 2021;120(9):3083-3090. doi: 10.1007/s00436-021-07264-y
 12. Heym EC, Kampen H, Fahle M, Hohenbrink TL, Schäfer M, Scheuch DE, Walther D. *Anopheles plumbeus* (Diptera: Culicidae) in Germany: updated geographic distribution and public health impact of a nuisance and vector mosquito. *Tropical Medicine & International Health*. 2017;22(1):103-112. doi: 10.1111/tmi.12805
 13. Pili E., Marchi A. Chromosome evolution in treehole breeding *Anopheles* (Diptera, Culicidae). *Italian Journal of Zoology*. 1999;66(1):33-37.

Информация об авторах:

Бега Анна Геннадьевна, канд. биол. наук, м.н.с. лаборатории экспериментальной биологии и биотехнологии НОЦ в г. Черногловка Государственного университета просвещения (Москва, Россия), н.с. лаборатории генетики насекомых института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН (Москва, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0011-7642>

E-mail: anni.miya@gmail.com

Логинов Денис Николаевич, н.с. лаборатории паразитологии Государственного научно-производственного объединения «Научно-практический центр Национальной академии наук Белоруссии по биоресурсам» (Минск, Республика Беларусь).

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-8148-0314>

E-mail: kavax@yandex.by

Гордеев Михаил Иванович, проф., д-р биол. наук, зав. кафедрой общей биологии и биоэкологии Государственного университета просвещения (Москва, Россия), г.н.с. аналитической лаборатории экологического мониторинга Российского государственного университета народного хозяйства имени В.И. Вернадского (Балашиха, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9031-6655>

E-mail: gordeev_mikhail@mail.ru

Горячева Ирина Игоревна, д-р биол. наук, зав. лабораторией генетики насекомых Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН (Москва, Россия), в.н.с. лаборатории экспериментальной биологии и биотехнологии НОЦ в г. Черногловка Государственного университета просвещения (Москва, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1913-5987>

E-mail: iigoryacheva@mail.ru

Бородин Лев Сергеевич, студент, делопроизводитель кафедры общей биологии и биоэкологии Государственного университета просвещения (Москва, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-2743-8620>

E-mail: lev.borodin2016@yandex.ru

Ли Елизавета Юрьевна, аспирант, м.н.с. лаборатории экспериментальной биологии и биотехнологии НОЦ в г. Черноголовка Государственного университета просвещения (Москва, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-7748-0767>

E-mail: lilizaveta@mail.ru

Москаев Антон Вячеславович, канд. биол. наук, зав. лабораторией экспериментальной биологии и биотехнологии НОЦ в г. Черноголовка, доцент кафедры общей биологии и биоэкологии факультета естественных наук Государственного университета просвещения (Москва, Россия), в.н.с. аналитической лаборатории экологического мониторинга Российского государственного университета народного хозяйства имени В.И. Вернадского (Балашиха, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0592-3691>

E-mail: anton-moskaev@yandex.ru

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Information about the authors:

Anna G. Bega, Cand.Sci. (Biol.), Junior Researcher of Experimental Biology and Biotechnology SEC in Chernogolovka Federal State University of Education (Moscow, Russian Federation), Researcher Laboratory of Insect Genetics Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences (Moscow, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0011-7642>

E-mail: anni.miya@gmail.com

Denis N. Loginov, Researcher Laboratory of Parasitology SNPO "Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources" (Minsk, Republic of Belarus).

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-8148-0314>

E-mail: kavax@yandex.by

Mikhail I. Gordeev, prof., Doct. Sci. (Biol.), Head of the Department of General Biology and Ecology Federal State University of Education (Moscow, Russian Federation), Chief Scientist of the Analytical Laboratory of Environmental Monitoring Vernadsky Russian State University of National Economy (Balashiha, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9031-6655>

E-mail: gordeev_mikhail@mail.ru

Irina I. Goryacheva, Doct.Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Insect Genetics Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences (Moscow, Russian Federation), Leading Researcher of Experimental Biology and Biotechnology SEC in Chernogolovka Federal State University of Education (Moscow, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1913-5987>

E-mail: iigoryacheva@mail.ru

Lev S. Borodin, Student, Laboratory Assistant at the Department of General Biology and Bioecology of the Federal State University of Education (Moscow, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-2743-8620>

E-mail: lev.borodin2016@yandex.ru

Elizaveta Y. Lee, Postgraduate Student, Junior Researcher of Experimental Biology and Biotechnology SEC in Chernogolovka Federal State University of Education (Moscow, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-7748-0767>

E-mail: lilizaveta@mail.ru

Anton V. Moskaev, Cand.Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Experimental Biology and Biotechnology SEC in Chernogolovka Federal, Associate Professor Department of General Biology and Ecology Federal State University of Education (Moscow, Russian Federation), Leading Researcher of the Analytical Laboratory of Environmental Monitoring Vernadsky Russian State University of National Economy (Balashiha, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0592-3691>

E-mail: anton-moskaev@yandex.ru

The Authors declare no conflict of interest.

*Статья поступила в редакцию 06.10.2024;
одобрена после рецензирования 22.11.2024; принята к публикации 03.03.2025.*

*The article was submitted 06.10.2024;
approved after reviewing 22.11.2024; accepted for publication 03.03.2025.*

Научная статья

УДК 575.827.2

doi: 10.17223/19988591/69/3

**Поиск сигналов естественного отбора в локусах генома,
ассоциированных с заболеваниями, приводящими
к нарушениям когнитивных функций человека,
в популяциях Северной Евразии**

Анна Владимировна Бочарова¹, Вадим Анатольевич Степанов²

^{1, 2} *НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, Томск, Россия*

¹ <https://orcid.org/0000-0003-2690-8802>, anna.bocharova@medgenetics.ru

² <https://orcid.org/0000-0002-5166-331X>, vadim.stepanov@medgenetics.ru

Аннотация. Расселение современного человека около 100 000 лет назад из места происхождения в Восточной Африке по территории земного шара сопровождалось различными процессами генетической адаптации. Для характеристики адаптивной эволюции в современных популяциях человека необходима информация о локусах генома, которые были под действием положительного отбора. Эти данные являются ценным материалом для понимания генетической структуры популяций человека, а также для установления причин подверженности к ряду распространенных болезней и их распределению в современных популяциях. В нашей работе выполнен поиск сигналов естественного отбора в локусах генома, ассоциированных с заболеваниями, приводящими к нарушениям когнитивных функций человека, в 16 популяциях Северной Евразии. Для мультиплексного генотипирования 28 SNP-маркеров использовали технологию MALDI-TOF масс-спектрометрии. При оценке селективной нейтральности исследованных генетических маркеров с помощью теста Эвенса–Ваттерсона отклонение от нейтральности обнаружено для 10 SNP. В популяциях Северной Евразии действие естественного отбора вносит вклад в формирование генетического разнообразия по генам, ассоциированным с шизофренией и болезнью Альцгеймера.

Ключевые слова: Северная Евразия, естественный отбор, когнитивные функции, SNP, локус, мультиплексное генотипирование

Для цитирования: Бочарова А.В., Степанов В.А. Поиск сигналов естественного отбора в локусах генома, ассоциированных с заболеваниями, приводящими к нарушениям когнитивных функций человека, в популяциях Северной Евразии // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2025. № 69. С. 20–28. doi: 10.17223/19988591/69/3

Original article

doi: 10.17223/19988591/69/3

**Search of natural selection signals in genomic loci associated
with diseases leading to impairment of human cognitive functions
in Northern Eurasia populations**

Anna V. Bocharova¹, Vadim A. Stepanov²

^{1, 2} *Research Institute of Medical Genetics Tomsk National Research Medical Center,
Tomsk, Russian Federation*

¹ <https://orcid.org/0000-0003-2690-8802>, anna.bocharova@medgenetics.ru

² <https://orcid.org/0000-0002-5166-331X>, vadim.stepanov@medgenetics.ru

Summary. In recent years, the genetic component of many general common diseases has been considered from the point of view of evolutionary context: asthma, chronic obstructive pulmonary disease, cancer, obesity, diabetes. The genetic history of populations leads to the accumulation of specific frequencies. Modern susceptibility to common pathological phenotypes could have had a certain adaptive significance in the past during the dispersal of humans across the globe. Of particular interest are diseases with phenotypes associated with cognitive impairment, such as schizophrenia, Alzheimer's disease, bipolar disorder, autism and others. Diseases associated with post-reproductive age (various types of dementia), as well as various manifestations of psychotic disorders, which were previously uncommon, are currently acquiring enormous socio-economic significance throughout the world. Evolutionary hypotheses have also been proposed for schizophrenia and Alzheimer's disease. The indigenous ethnic groups of Northern Eurasia are of particular interest to the researcher. Until recently, populations were isolated, isolated both by geography of residence and by linguistic and cultural characteristics, which led to genetic isolation. In this regard, the gene pool of populations of Northern Eurasia is an important source of genetic information. In connection with all of the above, the goal of the work was to search for signals of natural selection in the loci of the genome associated with schizophrenia, Alzheimer's disease, in the populations of Northern Eurasia. In our work, a search was performed for signals of natural selection in the loci of the genome associated with diseases leading to cognitive impairment in humans in 16 populations of Northern Eurasia: Russians, Udmurts, Khanty, Khakasses, northern and southern Kyrgyz, Yakuts, Buryats, Nivkhs, Chukchi, Kazakhs, Uzbeks, Altaians, Yakuts, Tuvins. MALDI-TOF mass spectrometry technology (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass-Spectrometry) was used for multiplex genotyping of 28 SNP markers. In our work, when analyzing selective neutrality using the Ewens-Watterson neutrality test for 28 markers, deviation from neutrality was found in 10 SNPs: rs10273775 of the *CNTNAP2* gene, rs1031381 of the *NCAPD3* gene, rs12922317 of the *SNX29* gene, rs1466662 of the *DCHS2* gene, rs1532278 of the *CLU* gene, rs16887244 of the *LSM1* gene, rs3826656 of the *CD33* gene, rs433598 of the *ACSM1* gene, rs561655 near the *PICALM* gene, rs6859 of the *NECTIN2* gene. The maximum number of populations for markers that have a deviation from selective neutrality was found for the genetic locus rs1031381 of the *NCAPD3* gene - 10 populations (southern Kyrgyz, Altaians, Buryats, Koryaks, Tuvins, Khanty, Kazakhs, Udmurts, Kets, Uzbeks), while the minimum number of populations was identified for the marker rs16887244 of the *LSM1* gene - one population (Nivkhs). In the present study, signals of natural selection were detected in all 16 populations. Interestingly, for the populations of northern Kyrgyz, Buryats, Koryaks, Khakasses and Udmurts, the effect of selection was only directional, and for the Russian population, the effect of balancing selection was noted, in the remaining ten populations, the effect of two types of selection was shown. For individual markers, only balancing selection was observed (rs16887244 of the *LSM1* gene), while exclusively directional selection was detected for rs1466662 of the *DCHS2* gene and rs561655 near the *PICALM* gene. It should be noted that of all 10 polymorphic variants of genes that showed deviation from selective neutrality, six SNPs showed statistically significant associations with schizophrenia or Alzheimer's disease in our previous studies in association analysis: rs12922317 of the *SNX29* gene, rs1466662 of the *DCHS2* gene, rs1532278 of the *CLU* gene, rs16887244 of the *LSM1* gene, rs561655 near the *PICALM* gene, rs6859 of the *NECTIN2* gene.

The results of our work indicate a significant role of natural selection in the populations of Northern Eurasia in the formation of genetic diversity in the genes of diseases associated with human cognitive impairment, such as schizophrenia and Alzheimer's disease.

The article contains 1 Table, 10 References.

Keywords: Northern Eurasia, natural selection, cognitive functions, SNP, locus, multiplex genotyping

For citation: Bocharova AV, Stepanov VA. Search for signals of natural selection in genomic loci associated with diseases leading to impairments of human cognitive functions in Northern Eurasia populations. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2025;69:20-28. doi: 10.17223/19988591/69/3

Введение

В последние годы генетическая составляющая многих широко распространенных многофакторных заболеваний рассматривается с точки зрения эволюционного контекста [1–4]. Современная подверженность к частым патологическим фенотипам могла иметь определенное адаптивное значение в прошлом при расселении человека по земному шару. Особый интерес вызывают заболевания с фенотипами, связанными с нарушениями когнитивных функций, такие как шизофрения (ШЗ), болезнь Альцгеймера (БА), биполярное расстройство, аутизм и др. Заболевания, связанные с пострепродуктивным возрастом (различные виды деменций), а также разнообразные проявления психотических расстройств, которые раньше встречались нечасто, в настоящее время приобретают огромное социально-экономическое значение во всем мире.

Коренные этносы Северной Евразии представляют особенный интерес для исследователя. Связано это с тем, что до сих пор эти популяции слабо изучены. Еще одна причина интереса к коренным этносам связана с уникальностью их генофондов, которые развивались изолированно. Еще совсем недавно популяции были обособленными, изолированными как по географии проживания, так и по языковым и культурным особенностям, что привело к генетической изоляции. В связи с этим генофонд популяций Северной Евразии является важным источником генетической информации. В связи со всем вышеизложенным целью работы было провести поиск сигналов естественного отбора в локусах генома, ассоциированных с шизофренией, болезнью Альцгеймера, в популяциях Северной Евразии.

Материалы и методы

Исследованы выборки 16 популяций, представляющие разные этно-территориальные группы населения Северной Евразии: русские, удмурты, ханты, хакасы, киргизы северные и южные, якуты, буряты, нивхи, чукчи, казахи, узбеки, алтайцы, якуты, тувинцы из биобанка коллекции НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ РАН «Биобанк населения Северной Евразии». Суммарный объем выборки составил 1 508 неродственных индивидов с отсутствием метисации более чем в трех поколениях. Этническая принадлежность и родословная каждого индивида были установлены на основании индивидуального анкетирования.

Генетические маркеры были выбраны на основании четких критериев: высокодостоверная ассоциация с фенотипом, полученная по данным опубликованных полногеномных ассоциативных исследований, – GWAS ($p \leq 5 \times 10^{-7}$); тип маркера – однонуклеотидный полиморфизм (SNP); частота редкого аллеля больше 5% хотя бы в одной популяции HarMap. Затем был разработан протокол мультиплексного генотипирования 28 SNP-маркеров с помощью технологии MALDI-TOF масс-спектрометрии на генетическом анализаторе MassARRAY Analyzer 4 фирмы «Agena Bioscience» (США).

Оценка селективной нейтральности исследованных генетических маркеров, ассоциированных с заболеваниями, ведущими к нарушениям КФ человека, по 16 популяциям Северной Евразии была проведена с помощью теста Эвенса–Ваттерсона (программа «Arlequin 3.1»). О направленности отклонения от селективной нейтральности можно сделать вывод по неравенству наблюдаемой (F_o) и ожидаемой (F_e) гомозиготности. Так, если показано статистически значимое уменьшение значения наблюдаемой гомозиготности по отношению к ожидаемой ($F_o < F_e$), это говорит о действии балансирующего отбора на этот локус. Если же наблюдается статистически значимое увеличение наблюдаемой гомозиготности по отношению к ожидаемой ($F_o > F_e$), мы можем сделать вывод о действии направленного отбора.

Проведение исследования одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. Исследования проведены на базе Центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

Результаты исследования и обсуждение

С точки зрения эволюционного контекста было проанализировано значительное количество болезней человека (астма, хроническая обструктивная болезнь легких, рак, ожирение, сахарный диабет) [1, 2]. В отношении ШЗ и БА также были предложены эволюционные гипотезы [3–4]. В нашей работе при анализе селективной нейтральности 28 маркеров отклонение от нейтральности обнаружено у 10 SNP (таблица).

Для генетического локуса rs1031381 гена NCAPD3 было показано отклонение от селективной нейтральности в максимальном количестве популяций (10): южные киргизы, алтайцы, буряты, коряки, тувинцы, ханты, казахи, удмурты, кеты, узбеки. В то время как для маркера rs16887244 гена LSM1 было идентифицировано отклонение от селективной нейтральности только в одной популяции (нивхи).

В настоящем исследовании сигналы естественного отбора выявлены во всех 16 популяциях. Интересно, что для популяций северных киргизов, бурятов, коряков, хакасов и удмуртов действие отбора имело только направленный характер, а для русской популяции было отмечено действие балансирующего отбора, в остальных десяти популяциях показано действие двух типов отборов (см. таблицу). Для отдельных маркеров наблюдался только балансирующий отбор (rs16887244 гена *LSM1*), в то время как исключительно направленное действие отбора выявлено для rs1466662 гена *DCHS2* и rs561655 вблизи гена *PICALM*.

Отклонение от селективной нейтральности у 10 маркеров в исследованных 16 популяциях Северной Евразии
[Deviation from selective neutrality at 10 markers in 16 studied populations of Northern Eurasia]

Ген [Gene]	CNTNAP2	NCAPD3	SNX29*	PICALM/ RNU6-560P*	CLU*	CD33	LSM1*	DCHS2*	ACSM1	NECTIN2*
SNP	rs10273775	rs1031381	rs12922317	rs561655	rs1532278	rs3826656	rs16887244	rs1466662	rs433598	rs6859
Русские [Russian]	Баланс [Balance]									Баланс [Balance]
Удмурты [Udmurt]	Направл. [Direct]	Направл. [Direct]	Направл. [Direct]					Направл. [Direct]		
Узбеки [Uzbek]		Баланс [Balance]	Баланс [Balance]			Направл. [Direct]				
Казахи [Kazakh]		Направл. [Direct]		Направл. [Direct]		Баланс [Balance]				
С. Киргизы [N. Kyrgyz]						Направл. [Direct]				
Ю. Киргизы [S. Kyrgyz]		Баланс [Balance]						Направл. [Direct]		
Алтайцы [Altaiian]		Баланс [Balance]				Направл. [Direct]				
Буряты [Buryat]		Направл. [Direct]				Направл. [Direct]				
Хакасы [Khakassian]										Направл. [Direct]
Тувинцы [Tuvan]		Баланс [Balance]		Направл. [Direct]	Направл. [Direct]	Направл. [Direct]				Баланс [Balance]
Кеты [Kets]		Направл. [Direct]	Баланс [Balance]							
Ханты [Khanty]		Направл. [Direct]			Баланс [Balance]				Баланс [Balance]	Направл. [Direct]
Якуты [Yakut]				Направл. [Direct]						Баланс [Balance]

Коряки [Koryak]		Направл. [Direct]		Направл. [Direct]	Направл. [Direct]				
Нивхи [Nivkhi]	Баланс [Balance]				Направл. [Direct]	Баланс [Balance]			
Чукчи [Chukchi]				Направл. [Direct]	Баланс [Balance]			Направл. [Direct]	

Примечание. Направл. – на локус действует направленный отбор ($Fo > Fe$). Баланс – на локус действует балансирующий отбор ($Fo < Fe$). * – SNP, показавшие статистически значимые ассоциации с шизофренией или болезнью Альцгеймера в других наших работах при ассоциативном анализе [5–10].

[Note, Direct is locus is subject to directional selection ($Fo > Fe$), Balance is locus is subject to balancing selection ($Fo < Fe$), * - SNPs that showed statistically significant associations with schizophrenia or Alzheimer's disease in our other studies in association analysis [5-10]].

В целом более 35% изученных SNP отклоняются от гипотезы селективной нейтральности согласно результатам нашей работы.

Следует отметить, что из всех 10 полиморфных вариантов генов, показавших отклонение от селективной нейтральности, шесть SNP показали статистически значимые ассоциации с шизофренией или болезнью Альцгеймера в наших предыдущих работах при ассоциативном анализе: rs12922317 гена *SNX29*, rs1466662 гена *DCHS2*, rs1532278 гена *CLU*, rs16887244 гена *LSM1*, rs561655 вблизи гена *PICALM*, rs6859 гена *NECTIN2* [5–10].

Заключение

Результаты нашей работы говорят о существенной роли естественного отбора в популяциях Северной Евразии при формировании генетического разнообразия по генам заболеваний, связанных с нарушениями когнитивных функций человека, таких как шизофрения и болезнь Альцгеймера.

Список источников

1. Daschner A., González Fernández J. Allergy in an Evolutionary Framework // Journal of Molecular Evolution. 2020. Vol. 88, № 1. PP. 66–76. doi: 10.1007/s00239-019-09895-3
2. Watve M., Diwekar-Joshi M. What to expect from an evolutionary hypothesis for a human disease: The case of type 2 diabetes // Homo. 2016. Vol. 67, № 5. PP. 349–368. doi: 10.1016/j.jchb.2016.07.001
3. Fox M. 'Evolutionary medicine' perspectives on Alzheimer's Disease: Review and new directions // Ageing Research Reviews. 2018. Vol. 47. PP. 140–148. doi: 10.1016/j.arr.2018.07.008
4. Block J. High risk genotypes for schizophrenia may have been adaptive in the context of smallpox // Medical Hypotheses. 2020. Vol. 137. 109556. doi: 10.1016/j.mehy.2020.109556
5. Бочарова А.В., Марусин А.В., Макеева О.А., Степанов В.А., Жукова И.А., Жукова Н.Г., Алифиров В.М. Генетические варианты, связанные с нарушениями когнитивных функций человека при болезни Альцгеймера // Медицинская генетика. 2018. Т. 17, № 1. С. 14–19.
6. Bocharova A., Marusin A., Fedorenko O., Ivanova S., Stepanov V. Genetic markers of *CCDC60*, *DCHS2*, *LSM1* and *LOC105373605* demonstrate association with schizophrenia in Russian population. ESHG-2022 // European Journal of Human Genetics. 2023. Vol. 31. 199. doi: 10.1038/s41431-023-01339-3
7. Bocharova A., Vagaitseva K., Makeeva O., Marusin A., Zhukova N., Zhukova I., Alifirova V., Matveeva M., Stepanov V. Potential genetic markers of Alzheimer's Disease, which play a significant role in aging // Systems Biology and Biomedicine (SBioMed-2018). Symposium. Abstracts. The Eleventh International Conference. Novosibirsk, 2018. PP. 26–27.
8. Бочарова А.В., Марусин А.В., Иванова С.А., Федоренко О.Ю., Семке А.В., Степанов В.А. Генетические варианты генов *TCF4*, *LSM1*, и *CCDC60* ассоциированы с шизофренией // Медицинская генетика. 2020. Т. 19, № 4. С. 17–19. doi: 10.25557/2073-7998.2020.04.17-19
9. Stepanov V., Bocharova A., Marusin A., Saduakasova K., Svyatova G., Zhukova N., Zhukova I., Alifirova V. Replicative genetic association analysis reveals genetic markers of schizophrenia and Alzheimer's disease in Russians and Kazakhs and demonstrates overlapping associations pattern between two diseases // Annals of Translational Medicine. 2015. Vol. 3 (S2). AB166. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.AB166

10. Bocharova A., Vagaitseva K., Marusin A., Zhukova N., Zhukova I., Minaycheva L., Makeeva O., Stepanov V. Association and Gene-gene Interactions Study of Late-onset Alzheimer's Disease in the Russian Population // *Genes*. 2021. Vol. 12. 1647. doi: 10.3390/genes12101647

References

1. Daschner A, González Fernández J. Allergy in an Evolutionary Framework. *Journal of Molecular Evolution*. 2020;88(1):66-76. doi: 10.1007/s00239-019-09895-3
2. Watve M, Diwekar-Joshi M. What to expect from an evolutionary hypothesis for a human disease: The case of type 2 diabetes. *Homo*. 2016;67(5):349-368. doi: 10.1016/j.jchb.2016.07.001
3. Fox M. 'Evolutionary medicine' perspectives on Alzheimer's Disease: review and new directions. *Ageing Research Reviews*. 2018;47:140-148. doi: 10.1016/j.arr.2018.07.008
4. Block J. High risk genotypes for schizophrenia may have been adaptive in the context of smallpox. *Medical Hypotheses*. 2020;137:109556. doi: 10.1016/j.mehy.2020.109556
5. Bocharova AV, Marusin AV, Makeeva OA, Zhukova IA, Zhukova NG, Alifirova VM, Stepanov VA. Genetic markers of decline human cognitive functions in Alzheimer's disease. *Medical Genetics*. 2018;17(1):14-19. In Russian, English summary
6. Bocharova A, Marusin A, Fedorenko O, Ivanova S, Stepanov V. Genetic markers of *CCDC60*, *DCHS2*, *LSM1* and *LOC105373605* demonstrate association with schizophrenia in Russian population. ESHG-2022. *European Journal of Human Genetics*. 2023;31:199. doi: 10.1038/s41431-023-01339-3
7. Bocharova A, Vagaitseva K, Makeeva O, Marusin A, Zhukova N, Zhukova I, Alifirova V, Matveeva M, Stepanov V. Potential genetic markers of Alzheimer's Disease, which play a significant role in aging. In: *Systems Biology and Biomedicine (SBioMed-2018)*. Proc. of the Eleventh International Conference (Novosibirsk, Russia, 21–22 August, 2018). Novosibirsk: ICG SB RAS; 2018. pp. 26-27.
8. Bocharova AV, Marusin AV, Ivanova SA, Fedorenko OU, Semke AV, Stepanov VA. Genetic variants of the *TCF4*, *LSM1*, and *CCDC60* genes are associated with schizophrenia. *Medical Genetics*. 2020;19(4):17-19. doi: 10.25557/2073-7998.2020.04.17-19 In Russian, English summary
9. Stepanov V, Bocharova A, Marusin A, Saduakasova K, Svyatova G, Zhukova N, Zhukova I, Alifirova V. Replicative genetic association analysis reveals genetic markers of schizophrenia and Alzheimer's disease in Russians and Kazakhs and demonstrates overlapping associations pattern between two diseases. *Annals of Translational Medicine*. 2015;3(S2):AB166. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.AB166
10. Bocharova A, Vagaitseva K, Marusin A, Zhukova N, Zhukova I, Minaycheva L, Makeeva O, Stepanov V. Association and Gene-gene Interactions Study of Late-onset Alzheimer's Disease in the Russian Population. *Genes*. 2021;12:1647. doi: 10.3390/genes12101647

Информация об авторах:

Бочарова Анна Владимировна, канд. биол. наук, н.с. лаборатории эволюционной генетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (Томск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2690-8802>

E-mail: anna.bocharova@medgenetics.ru

Степанов Вадим Анатольевич, академик РАН, д-р биол. наук, профессор, директор Томского НИМЦ (Томск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5166-331X>

E-mail: vadim.stepanov@medgenetics.ru

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Information about the authors:

Anna V. Bocharova, Cand.Sci. (Biol.), Researcher of the Laboratory of Evolutionary Genetics, Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center (Tomsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2690-8802>

E-mail: anna.bocharova@medgenetics.ru

Vadim A. Stepanov, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Doctor of Biological Sciences, Professor, Director of the Tomsk National Research Medical Center (Tomsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5166-331X>

E-mail: vadim.stepanov@medgenetics.ru

The Authors declare no conflict of interest.

*Статья поступила в редакцию 31.07.2024;
одобрена после рецензирования 28.10.2024; принята к публикации 03.03.2025.*

*The article was submitted 31.07.2024;
approved after reviewing 28.10.2024; accepted for publication 03.03.2025.*

Научная статья

УДК 575.17

doi: 10.17223/19988591/69/4

Генетическое разнообразие популяций теленгитов и алтай-кижи по маркерам, используемым в ДНК-идентификации

Ксения Валерьевна Вагайцева¹, Никита Александрович Колесников²,
Максим Дмитриевич Скалин³, Лариса Витальевна Валихова⁴,
Ольга Дмитриевна Рузавина⁵, Дарья Евгеньевна Пестрецова⁶,
Анастасия Николаевна Высочина⁷, Владимир Николаевич Харьков⁸,
Вадим Анатольевич Степанов⁹

^{1, 2, 4, 5, 8, 9} Научно-исследовательский институт медицинской генетики
Томского национального исследовательского медицинского центра
Российской академии наук, Томск, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей
генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

^{6, 7} Национальный исследовательский Томский государственный университет,
Томск, Россия

¹ <https://orcid.org/0000-0003-4877-9749>, kseniya.simonova@medgenetics.ru

Аннотация. Потребность в увеличении информативности генетической экспертизы при установлении родства как в случаях экспертизы в гражданских делах, так и при идентификации личности людей, погибших в авиакатастрофах, природных и техногенных пожарах, террористических атаках, ураганах, цунами и прочих крупномасштабных бедствиях привела к активной разработке дополнительных наборов маркеров для ДНК-идентификации. Для корректного использования новых мультиплексов необходимо иметь представление о генетической структуре популяции, из которой происходит анализируемый ДНК-профиль. В данной работе представлены результаты анализа генетического разнообразия двух популяций южных алтайцев по двум системам генетических маркеров, способных увеличить надежность и информативность генетической экспертизы при определении родства в сложных случаях. Первая система основана на микросателлитных маркерах X-хромосомы, вторая включает 23 STR-маркера аутосом. Показано, что уровень ожидаемой гетерозиготности по обеим системам маркеров в популяции теленгитов ниже, чем в популяции алтай-кижи. Полученные результаты показали значимые генетические различия между теленгитами и алтай-кижи (R_{st} 0,006–0,007, $p = 0,000–0,002$), которые необходимо учитывать при проведении вероятностных расчетов в генетической экспертизе.

Ключевые слова: теленгиты, алтай-кижи, популяционная генетика, генетическая экспертиза, ДНК-идентификация

Источник финансирования: исследование X-STR выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-74-10058. Часть работы, посвященная анализу аутосомных STR-маркеров, выполнена в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования № 122112800026-1.

Для цитирования: Вагайцева К.В., Колесников Н.А., Скалин М.Д., Валихова Л.В., Рузавина О.Д., Пестрецова Д.Е., Высочина А.Н., Харьков В.Н., Степанов В.А. Генетическое разнообразие популяций теленгитов и алтай-кижи

по маркерам, используемым в ДНК-идентификации // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2025. № 69. С. 29–37. doi: 10.17223/19988591/69/4

Original article

doi: 10.17223/19988591/69/4

Genetic diversity of Telengite and Altai-kizhi populations by markers used in forensic genetics

Ksenia V. Vagaitseva¹, Nikita A. Kolesnikov², Maxim D. Scalin³,
Larisa V. Valikhova⁴, Olga D. Rusavina⁵, Daria E. Pestrecova⁶,
Anastasia N. Visochina⁷, Vladimir N. Kharkov⁸, Vadim A. Stepanov⁹

^{1, 2, 4, 5, 8, 9} *Research Institute of Medical Genetics Tomsk National Medical Research Center, Tomsk, Russia*

³ *Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

^{6, 7} *Tomsk State University, Tomsk, Russia*

¹ <https://orcid.org/0000-0003-4877-9749>, kseniya.simonova@medgenetics.ru

Summary. The need to improve the accuracy of genetic testing in establishing kinship, both in civil cases and when identifying the remains of people after plane crashes, fires, terrorist attacks and other disasters, has led to the development of new methods. One is to expand the panel of used genetic markers by adding highly informative autosomal STR markers. These markers can help identify more closely related individuals, making it easier to determine kinship between parents and children, siblings and step-brothers. This can be especially useful in difficult cases where traditional methods may not be sufficient. The second is the use of additional markers located on the sex chromosomes. Their features of inheritance simplify the examination of complex cases and provide advantages in the analysis of mixed sample. To correctly use new multiplexes, it is important to have an understanding of the genetic structure of the population from which the DNA profile originates. The level of genetic diversity directly affects the reliability and effectiveness of genetic analysis. In this study, we compared two populations of Southern Altaians using two different systems of genetic markers. These markers can increase the reliability and informative value of genetic examinations in difficult cases of kinship determination. The first set includes 18 STR markers (HPRTB, DXS8378, DXS6797, DXS6804, GATA165B12, DXS9902, DXS6810, DXS8377, DXS101, DXS7133, DXS7424, DXS7423, DXS6789, GATA31E08, DXS10079, DXS10103, and DXS7132), while the second set includes 23 autosomal STR markers (D20S1082, D6S474, D14S1434, D4S2666, D1S1677, D11S4463, D4S2364, D9S1122, D2S1776, D17S974, D10S1435, D3S3053, D5S2500, D1S1627, D3S4529, D2S1360, and D3S1744). The assessment of genotype distributions for Hardy-Weinberg equilibrium was only performed for autosomal markers, as samples from men were analyzed in this study. For the Telengite population, the genotype distributions at the D4S2666 and D10S2325 loci deviated from Hardy-Weinberg expectations. For the Altai-Kizhi population, a larger number of loci showed deviations from Hardy-Weinberg: D6S474, D4S2364, D1S1627, and D10S2325. In all cases, the observed level of heterozygosity was lower than expected. Therefore, it can be assumed that deviations from equilibrium were caused by a high rate of intra-district endogamous marriages among Southern Altaians. The average value of expected heterozygosity in the Telengite population was lower than in the Altai-Kizhi population for both X-STR and ASTR markers. At the same time, the average expected heterozygosity for autosomal STR panel was higher than for X-STR. The Telengite population had the largest total number of

alleles: 178 for autosomal markers and 121 for X-STR markers. These values are relatively low compared to other populations, such as the Russian population with 228 alleles for 20 ASTRs and Belarusians with 250 alleles. The assessment of the genetic distance between samples of southern Altaians using the Rst method revealed significant differences between Telengites and Altai-Kizhis, while a higher genetic similarity was found for autosomal STR markers (0.006, $p = 0.000$) compared to X-STR markers (0.007, $p = 0.002$). Given the significant genetic differences identified between these two ethnic groups in southern Altai, it is important to consider the reference allele frequencies for each population during genetic analysis. Combining Altai-Kizhi and Telengite samples into a single group (southern Altai) could reduce the reliability of genetic testing in the Telengite population.

The article contains 11 References.

Keywords: Telengites, Altai-kizhi, population genetics, forensic genetics

Fundings: The X-STR study was carried out at the expense of a grant from the Russian Science Foundation No. 23-74-10058. The part of the work devoted to the analysis of autosomal STR markers was performed within the framework of the State Assignment of the Ministry of Science and Higher Education No. 122112800026-1.

For citation: Vagaytseva KV, Kolesnikov NA, Skalin MD, Velikhova LV, Ruzavina OD, Pestretsova DE, Vysochina AN, Kharkov VN, Stepanov VA. Genetic diversity of Telengite and Altai-kizhi populations by markers used in forensic genetics. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2025;69:29-37. doi: 10.17223/19988591/69/4

Введение

Популяционно-генетические исследования населения России, выполненные с использованием различных систем генетических маркеров, выявили высокую внутри- и межпопуляционную генетическую вариабельность. Эффекты демографической истории человечества привели к тому, что коренные народы, находящиеся на наибольшем географическом удалении по путям миграции, пройденным в ходе эволюции человека, уступают по уровню генетического разнообразия популяциям Европы. Такая вариация напрямую влияет на надежность генетической экспертизы в ДНК-идентификации. Вероятность ложноположительного результата генетической экспертизы, основанной на анализе стандартных аутосомных STR-маркеров, при определении родственных отношений в сложных случаях (установление родства между индивидом и одним предполагаемым родителем (дуо), установление родства между предполагаемыми братьями/сестрами, бабушками/дедушками и внуками и т.д.) в популяциях с низким уровнем генетического разнообразия возрастает [1–3].

Увеличение информативности генетической тест-системы, основанной на STR-маркерах, возможно несколькими путями. Один – расширение панели используемых генетических маркеров путем добавления высокоинформативных аутосомных STR-маркеров. Доказано, что дополнительные STR могут повысить эффективность генетического тестирования в определении истинного родства между родителем и ребенком, родными или сводными братьями и сестрами, а также при экспертизе в сложных случаях опре-

деления родственных отношений [4]. Второй – использование дополнительных маркеров, локализованных на половых хромосомах, особенности наследования которых упрощают проведение экспертизы сложных случаев и дают преимущества при анализе смешанных образцов за счет гемизиготности мужчин [5]. Кроме того, на достоверность генетической экспертизы в значительной степени влияют референсные частоты аллелей, используемые в вероятностных расчётах. Для успешного применения генетической тест-системы в практике ДНК-идентификации необходимо иметь представление о генетической структуре популяции по выбранным локусам.

Результаты исследований генетической структуры алтайских популяций, основанные на аутосомных и Y-хромосомных маркерах, демонстрируют, с одной стороны, генетическое родство этих народов, а с другой – сохранение их гетерогенности [6, 7]. У алтайцев был выявлен довольно высокий уровень коэффициента геномного инбридинга [8], что свидетельствует о низком генетическом разнообразии среди коренного населения Алтая. В популяции теленгитов отмечается самый низкий уровень гетерозиготности среди малых народов Сибири [9]. Это подчеркивает актуальность проведения анализа генетической структуры популяций по предлагаемым для генетической экспертизы локусам перед внедрением дополнительных инструментов в практику. Цель данного исследования заключается в определении уровня генетического разнообразия и оценке степени генетической дифференциации двух популяций южных алтайцев с использованием двух систем генетических маркеров, разработанных для повышения надежности генетической экспертизы на территории Российской Федерации.

Материалы и методы

Материалом исследования послужили выборки мужчин южных алтайцев (77 – теленгиты, 107 – алтай-кижи). Забор венозной крови у доноров проводили с соблюдением процедуры письменного информированного согласия на проведение исследования. На каждого донора составлялась анкета с его родословной, указанием этнической принадлежности и мест рождения предков. Метисы в выборки не входили. Генотипирование образцов по аутосомным STR-маркерам проводили методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с последующим анализом продуктов амплификации на автоматическом генетическом анализаторе НАНОФОР-05 (Синтол, Россия). В работе использовались два мультиплексных набора маркеров: включающий 18 X-STR (HPRTB, DXS8378, DXS6797, DXS6804, GATA165B12, DXS9902, DXS6810, DXS8377, DXS101, DXS7133, DXS7424, DXS7423, DXS6789, GATA31E08, DXS10079, DXS10103, DXS7132, DXS9895) и разрабатываемый в лаборатории геномной идентификации совместно с компанией ООО «Гордиз» (Россия) мультиплексный набор аутосомных STR, включающий 23 маркера (D20S1082, D6S474, D14S1434, D4S2666, D1S1677, D11S4463, D4S2364, D9S1122, D2S1776, D17S974, D10S1435, D3S3053, D5S2500, D1S1627, D3S4529, D2S1360, D3S1744, D17S1301,

D8S1132, Penta D, D10S2325, D7S1517, Penta E). Для генотипирования использовали реакционный микс и активатор производства компании «Гордиз» (Россия). Реакционная смесь (10 мкл) включала: 2 мкл активатора, 2 мкл реакционного микса, 0,16 мкл смеси праймеров, 1 мкл ДНК, 4,84 мкл ddH₂O. Генотипирование STR-маркеров проводилось с помощью капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе НАНОФОР 05 (Синтол, Россия). Частоты аллелей рассчитывали стандартным способом с помощью программного пакета MS Excel. Оценку значения ожидаемой гетерозиготности, анализ генетической дистанции по Рейнгольду (R_{st}) и оценку соответствия распределений генотипов равновесию Харди–Вайнберга проводили с использованием программного средства Arlequin v. 3.5 [10]. Экспериментальные исследования проведены на базе Центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием «Медицинская геномика» (НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ).

Результаты исследования и обсуждение

В контексте исследования генетического разнообразия и его закономерностей важным аспектом является анализ соответствия распределения генотипов равновесию Харди–Вайнберга, что позволяет выявить нарушения, обусловленные генетическими и социальными факторами, существующими в исследуемых популяциях. Оценку соответствия распределения генотипов равновесию Харди–Вайнберга проводили только для аутосомных STR, поскольку в данной работе анализировались выборки мужчин. Распределения генотипов локусов D4S2666 ($0,000 \pm 0,000$), D10S2325 ($0,000 \pm 0,000$) отклоняются от равновесия Харди–Вайнберга в популяции теленгитов. В популяции алтай-кижи отклонения зафиксированы для большего числа локусов: D6S474 ($0,001 \pm 0,000$), D4S2364 ($0,000 \pm 0,000$), D1S1627 ($0,000 \pm 0,000$), D10S2325 ($0,000 \pm 0,000$). Во всех случаях значения наблюдаемого уровня гетерозиготности ниже ожидаемого, в связи с этим можно предполагать, что отклонения от равновесия вызваны высоким индексом внутрирайонных эндогамных браков южных алтайцев.

Среднее значение ожидаемой гетерозиготности в популяции теленгитов (H_e X-STR = $0,723 \pm 0,076$, H_e ASTR = $0,750 \pm 0,081$) по обеим системам маркеров ниже, чем в популяции алтай-кижи (H_e X-STR = $0,726 \pm 0,098$, H_e ASTR = $0,753 \pm 0,075$). В то же время уровень средней ожидаемой гетерозиготности по панели аутосомных STR выше, чем для X-STR.

Наибольшее суммарное число аллелей было зафиксировано в популяции теленгитов: 178 аллелей аутосомных маркеров и 121 аллель X-STR-маркеров. Полученные значения сравнительно невысоки, к примеру, в популяции русских суммарное число аллелей 20 стандартных aSTR составляет 228, а у белорусов – 250 [11].

Оценка генетического расстояния между выборками южных алтайцев методом R_{st} показала наличие значимых различий между выборками теленгитов и алтай-кижи, при этом получено большее генетическое сходство по

аутосомным STR (0,006, $p = 0,000$), чем по X-STR-маркерам (0,007, $p = 0,002$).

Заключение

В ходе исследования были выявлены значимые генетические различия между двумя этносами южных алтайцев (по набору аутосомных STR 0,006, $p = 0,000$, по набору X-STR 0,007, $p = 0,002$). Полученные результаты подчеркивают необходимость при вероятностных расчетах в ДНК-идентификации ориентироваться на референсные частоты аллелей, выявленные для каждой популяции. Объединение алтай-кижи и теленгитов в одну выборку (южные алтайцы) повлечет снижение надежности генетической экспертизы в популяции теленгитов. Ориентируясь на низкий уровень генетического разнообразия аутосомных маркеров в популяциях алтайцев, можно рекомендовать совмещать оба типа генетических маркеров (аутосомные STR и X-STR) при проведении генетической экспертизы на родство, особенно в сложных случаях.

Список источников

1. Вагайцева К.В., Лопаткина М.Е., Колесников Н.А., Харьков В.Н., Степанов В.А. Информативность стандартных аутосомных STR в популяциях коренных народов России для определения родства первой степени // *Генетика*. 2024. Vol. 60, № 5. PP. 95–101. doi: 10.31857/S0016675824050078
2. Rohlf S.V., Fullerton S.M., Weir B.S. Familial identification: population structure and relationship distinguishability // *PLoS Genetics*. 2012. Vol. 8, № 2. e1002469. doi: 10.1371/journal.pgen.1002469
3. Zvenigorosky V., Sabbagh A., Gonzalez A., Fausser J.L., Palstra F., Romanov G., Solov'yev A., Barashkov N., Fedorova S., Crubézy É., Ludes B., Keyser C. The limitations of kinship determinations using STR data in ill-defined populations // *Int J Legal Med*. 2020. Vol. 134, № 6. PP. 1981–1990. doi: 10.1007/s00414-020-02298-w
4. O'Connor K.L., Butts E., Hill C.R., Butler J., Vallone P. Evaluating the effect of additional forensic loci on likelihood ratio values for complex kinship analysis // *The 21st International Symposium on Human Identification*. 2010. PP. 1–27.
5. Butler J.M., Hill C.R., Decker A.E., Kline M.C., Reid T.M., Vallone P.M. New Autosomal and Y-Chromosome STR Loci: Characterization and Potential Uses // *Proceedings of the 18th International Symposium on Human Identification*. 2007. PP. 1–42.
6. Харьков В.Н., Степанов В.А., Медведева О.Ф., Спиридонова М.Г., Воевода М.И., Тадинова В.Н., Пузырев В.П. Различия в структуре генофондов северных и южных алтайцев по гаплогруппам Y-хромосомы // *Генетика*. 2007. Т. 43, № 5. С. 675–687.
7. Балаганская О.А., Балановская Е.В., Лавряшина М.Б., Исакова Ж.Т., Сабитов Ж.М., Фролова С.А., Захарова Т.А. Полиморфизм Y хромосомы у тюркоязычного населения Алтае-Саян, Тянь-Шаня и Памира в контексте взаимодействия генофондов Западной и Восточной Евразии // *Медицинская генетика*. 2011. Т. 3, № 105. С. 12–22.
8. Колесников Н.А., Харьков В.Н., Зарубин А.А., Раджабов М.О., Воевода М.И., Губина М.А., Степанов В.А. Особенности геномного распределения регионов высокой гомозиготности у коренного населения Северной Евразии на индивидуальном и популяционном уровнях на основе анализа SNP высокой плотности // *Генетика*. 2021. Т. 57, № 11. С. 1261–1275. doi: 10.31857/S0016675821110059
9. Лавряшина М.Б., Ульянова М.В., Балаганская О.А., Балаганский А.Г., Балановская Е.В. Генетический портрет десяти малых народов Южной Сибири. Сообщение II. Гетерозиготность и подразделенность генофонда по данным об аутосомных ДНК-маркерах // *Медицинская генетика*. 2010. Т. 9, № 99. С. 16–23.

10. Excoffier L., Lischer H.E. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // *Molecular Ecology Resources*. 2010. № 10. PP. 564–567. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x
11. Харьков В.Н., Котова С.А., Колесников Н.А., Спивак Е.А., Вагайцева К.В., Забавская Т.В., Рыбакова В.И., Парфенова А.С., Верчук А.Н., Янковский Н.К., Степанов В.А. Генетическое разнообразие 21 аутосомного STR-маркера системы CODIS в популяциях Восточной Европы // *Генетика*. 2021. Т. 57, № 12. С. 1396–1402. doi: 10.31857/S0016675821120055

References

1. Vagaitseva KV, Lopatkina ME, Kolesnikov NA, Kharkov VN, Stepanov VA. Identification information value of standard autosomal STR in populations of indigenous peoples of Russia in determination of first degree relationship. *Russian Journal of Genetics*. 2024;60(5):676-681.
2. Rohlf RV, Fullerton SM, Weir BS. Familial identification: population structure and relationship distinguishability. *PLoS Genetics*. 2012;8(2):e1002469. doi: 10.1371/journal.pgen.1002469
3. Zvěniġorosky V, Sabbagh A, Gonzalez A, Fausser JL, Palstra F, Romanov G, Solovyev A, Barashkov N, Fedorova S, Crub  zy   , Ludes B, Keyser C. The limitations of kinship determinations using STR data in ill-defined populations. *Int J Legal Med*. 2020;134(6):1981-1990. doi: 10.1007/s00414-020-02298-w
4. O'Connor KL, Butts E, Hill CR, Butler J, Vallone P. Evaluating the effect of additional forensic loci on likelihood ratio values for complex kinship analysis. In: *The 21st International Symposium on Human Identification*. 2010. p. 1-27
5. Butler JM, Hill CR, Decker AE, Kline MC, Reid TM, Vallone PM. New Autosomal and Y-Chromosome STR Loci: Characterization and Potential Uses. In: *Proceedings of the 18th International Symposium on Human Identification*. 2007. p. 1-45
6. Kharkov VN, Stepanov VA, Medvedeva OF, Spiridonova MG, Voevoda MI, Tadinova VN, Puzyrev VP. Gene pool differences between northern and southern altaians inferred from the data on Y-chromosomal haplogroups. *Russian Journal of Genetics*. 2007;43(5):551-562. doi: 10.1134/S1022795407050110
7. Balaganskaya OA, Balanovskaya EV, Lavryashina MB, Isakova ZhT, Sabitov ZhM, Frolova SA, Zakharova TA. Y-chromosomal polymorphism in turkic-speaking populations from altai-sayan, tien-shan and pamir mountains in context of the interaction between western and Eastern Eurasian gene pools. *Medical genetics*. 2011;3(105):12-22. In Russian, English summary
8. Kolesnikov NA, Kharkov VN, Zarubin AA, Stepanov VA, Radzhabov MO, Voevoda MI, Gubina MA, Khusnutdinova EK, Litvinov SS, Ekomasova NV, Shtygasheva OV, Maksimova NR, Sukhomyasova AL. Features of the genomic distribution of runs of homozygosity in the indigenous population of northern Eurasia at the individual and population levels based on high density SNP analysis. *Russian Journal of Genetics*. 2021;57(11):1261-1275. doi: 10.1134/S1022795421110053
9. Lavryashina MB, Ul'yanova MV, Balaganskaya OA, Balaganskiy AG, Balanovskaya EV. Genetic portrait of ten small ethnic groups from southern Siberia. The message II. Heterozygosities and subdivided a gene pool of autosomal DNA markers. *Medical genetics*. 2010; 9(99):16-23. In Russian, English summary
10. Excoffier L, Lischer HE. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 2010;10:564-567. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x.
11. Kharkov VN, Kolesnikov NA, Vagaitseva KV, Stepanov VA, Kotova SA, Spivak EA, Zabavskaya TV, Rybakova VI, Parfenova AS, Verchuk AN, Yankovsky NK. Genetic diversity of 21 autosomic STR markers of the CODIS system in populations of Eastern

Europe. *Russian Journal of Genetics*. 2021;57(12):1396-1402. doi: 10.1134/S102279542112005X

Информация об авторах:

Вагайцева Ксения Валерьевна, канд. биол. наук, н.с. лаборатории геномной идентификации НИИ медицинской генетики ТНИМЦ (Томск, Россия).

ORCID: 0000-0003-4877-9749

E-mail: kseniya.simonova @medgenetics.ru

Колесников Никита Александрович, канд. биол. наук, н.с. лаборатории геномной идентификации НИИ медицинской генетики ТНИМЦ (Томск, Россия).

ORCID: 0000-0001-8855-577X

E-mail: nikita.kolesnikov@medgenetics.ru

Скалин Максим Дмитриевич, аспирант ИОГЕН им. Н. И. Вавилова РАН (Москва, Россия).

E-mail: maxskalin@gmail.com

Валихова Лариса Витальевна, аспирант Томского НИМЦ, м.н.с. лаборатории геномной идентификации (Томск, Россия).

ORCID: 0000-0002-9440-1678

E-mail: Larisa_Ermizova9@mail.ru

Рузавина Ольга Дмитриевна, м.н.с. лаборатории геномной идентификации НИИ медицинской генетики ТНИМЦ (Томск, Россия).

ORCID: 0009-0002-3962-8404

E-mail: ruzavella@mail.ru

Пестрецова Дарья Евгеньевна, магистрант Томского государственного университета (Томск, Россия).

Высочина Анастасия Николаевна, студентка Томского государственного университета (Томск, Россия).

Харьков Владимир Николаевич, д-р биол. наук, заведующий лабораторией геномной идентификации, ведущий научный сотрудник лаборатории эволюционной генетики НИИ медицинской генетики ТНИМЦ (Томск, Россия).

ORCID: 0000-0002-1679-2212

E-mail: vladimir-kharkov@medgenetics.ru

Степанов Вадим Анатольевич, академик РАН, д-р биол. наук, директор Томского НИМЦ, руководитель лаборатории эволюционной генетики НИИ медицинской генетики ТНИМЦ (Томск, Россия).

ORCID: 0000-0002-5166-331X

E-mail: vadim-stepanov@medgenetics.ru

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Information about the authors:

Ksenia V. Vagaitseva, Cand. Sci. (Biol.), Researcher at the Laboratory of Genomic Identification, Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center (Tomsk, Russian Federation).

ORCID: 0000-0003-4877-9749

E-mail: kseniya.simonova @medgenetics.ru

Nifita A. Kolesnikov, Cand. Sci. (Biol.), Researcher at the Laboratory of Genomic Identification, Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center (Tomsk, Russian Federation).

ORCID: 0000-0001-8855-577X

E-mail: nikita.kolesnikov@medgenetics.ru

Maxim D. Scalin, postgraduate student of the Institute of Genetics named after N.I. Vavilov of the Russian Academy of Sciences (Moscow, Russian Federation).

E-mail: maxskalin@gmail.com

Larisa V. Valikhova, postgraduate student of Tomsk National Research Medical Center, junior researcher of the laboratory of genomic identification (Tomsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9440-1678>

E-mail: Larisa_Ermizova9@mail.ru

Olga D. Rusavina, Junior Researcher, Laboratory of Genomic Identification, Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center (Tomsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-3962-8404>

E-mail: ruzavella@mail.ru

Daria E. Pestrecova, Master's student of the National Research Tomsk State University (Tomsk, Russian Federation).

Anastasia N. Visochina, student of the National Research Tomsk State University (Tomsk, Russian Federation).

Vladimir N. Kharkov, Dr. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Genomic Identification, Leading Researcher of the Laboratory of Evolutionary Genetics, Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center (Tomsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1679-2212>

E-mail: vladimir-kharkov@medgenetics.ru

Vadim A. Stepanov, Academician, Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biol.), Director of Tomsk National Research Medical Center, Head of the Laboratory of Evolutionary Genetics, Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center (Tomsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5166-331X>

E-mail: vadim-stepanov@medgenetics.ru

The Authors declare no conflict of interest.

*Статья поступила в редакцию 31.07.2024;
одобрена после рецензирования 11.11.2024; принята к публикации 03.03.2025.*

*The article was submitted 31.07.2024;
approved after reviewing 11.11.2024; accepted for publication 03.03.2025.*

Научная статья
УДК 575.1:595.773.4
doi: 10.17223/19988591/69/5

Эволюционная реорганизация взаиморасположения хромосом в пространстве ядер трофоцитов у близкородственных видов дрозофил

Ирина Эгоновна Вассерлауф¹, Константин Евгеньевич Усов²,
Гульнар Мухтаргазыевна Абылкасымова³,
Ануарбек Каримович Сибатаев⁴

^{1, 2} Национальный исследовательский Томский государственный университет,
Томск, Россия

³ Институт генетики и физиологии, Алматы, Казахстан,

⁴ Казахский агротехнический исследовательский университет им. С.С. Сейфуллина,
Астана, Казахстан

¹ irinawasserlauf@mail.ru

³ iggc@mail.ru

⁴ a.sibataev@kazatu.edu.kz

Аннотация. Ранее нами был проведен анализ ориентации политенных хромосом (морфотип ядра) в ядрах трофоцитов у близкородственных видов подгруппы *melanogaster* и группы *virilis* рода *Drosophila*. Был выявлен новый видоспецифичный признак – морфотип ядер трофоцитов у дрозофил, сходный с видами малярийных комаров. У дрозофил обнаружены четыре видоспецифичных морфологических типа ядра: 1) с локальным хромоцентром; 2) с диффузным хромоцентром; 3) с хромосомами, рассредоточенными в пространстве ядра; 4) с хромосомами, имеющими прикрепление к ядерной оболочке. Анализ собственных и литературных данных позволил выявить закономерность географического распространения видов подгруппы *melanogaster* и группы *virilis* с признаком «морфотип ядер трофоцитов». Установлено, что низкая температура и инбридинг, оказывают влияние на синاپтирование гомологичных хромосом в ядрах трофоцитов яиц и личинок в линиях *D. melanogaster*. Возможно, данные факторы в процессе эволюции оказывали влияние на преобразование морфотипа ядер трофоцитов (пространственной организации хромосом в ядре) у дрозофил. Эволюционные преобразования морфотипа ядер трофоцитов у видов происходили по схеме: от локального хромоцентра у филогенетически исходных видов к его частичному, а затем и к полному исчезновению у производных видов, при этом у ряда видов хромосомы рассредоточены в ядре и контактируют с ядерной оболочкой.

Ключевые слова: взаимное расположение хромосом в ядрах трофоцитов (морфотипы ядер), политенные хромосомы, *Drosophilidae*, виды подгруппы *melanogaster* и группы *virilis*, эволюционная цитогенетика

Источник финансирования: исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № FSWM-2020-0019).

Для цитирования: Вассерлауф И.Э., Усов К.Е., Абылкасымова Г.М., Сибатаев А.К. Эволюционная реорганизация взаиморасположения хромосом в пространстве ядер трофоцитов у близкородственных видов дрозофил // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2025. № 69. С. 38–47. doi: 10.17223/19988591/69/5

Evolutionary reorganization of chromosome interposition in the space of trophocyte nuclei in closely related *Drosophila* species

**Irina E. Wasserlauf¹, Konstantin E. Usov², Gulnar M. Abylkasymova³,
Anuarbek K. Sibataev⁴**

^{1, 2} Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

³ Institute of Genetics and Physiology, Almaty, Kazakhstan

⁴ Kazakh Agrotechnical Research University S.S. Seifullin, Astana, Kazakhstan

¹ irinawasserlauf@mail.ru

² iggc@mail.ru

³ a.sibataev@kazatu.edu.kz

Summary. One of the problems of systematics and phylogeny is the difficulty in establishing species affiliation in difficult-to-define groups of species (cryptic species), which are phenotypically similar to each other, but at the same time reproductively isolated and differ in genome structure. For most two-winged insects, the formation of giant polytene chromosomes with species-specific disc and interdisc structure is characteristic of the nuclei of salivary glands, trophocytes, and malpighian vessels. According to the structure of chromosomes species differ and phylogenetic trees between closely related species are built according to this feature. At the same time, there are species in which the structure of polytene chromosomes practically does not differ, such species are called homosequential. Therefore, it is difficult to establish phylogenetic relationships between these species. However, a new species trait has been discovered in malarial mosquitoes, by which homosequential species are also distinguished. This is the mutual arrangement of chromosomes in the space of trophocyte nuclei. In this connection, it is of great interest to study this phenomenon in other two-winged insects, especially in homosequent and cryptic species. In this connection, it was of great interest to study this phenomenon in other two-winged insects, especially in homosequent and in cryptic species. For the first time, the orientation of polytene chromosomes in the nuclei (nucleus morphotype) of the germinative cell system was analyzed in closely related species of the melanogaster subgroup and virilis group of the genus *Drosophila*. We have shown that a new species-specific trait, the nucleus morphotype, as well as that previously identified in malaria mosquito species, also occurs in closely related species of *Drosophila*. Four species-specific morphologic types of the nucleus were found in *Drosophila*: 1. With a local chromocenter; 2. With a diffuse chromocenter; 3. With chromosomes scattered in the space of the nucleus; 4. With chromosomes attached to the nuclear envelope (See Fig. 1). The regularity of distribution of species of melanogaster subgroup and virilis group by the feature “morphotype of trophocyte nuclei” correlating with phylogenetic centers of origin of species and geographical distribution of *Drosophila* species ranges above sea level was revealed. It was found that such factors as low temperature and inbreeding affect the synaptation of homologous chromosomes in the nuclei of ovarian trophocytes in *D. melanogaster* lines. It is possible that these factors may influence changes in the nucleus morphotype (spatial organization of chromosomes in the nucleus), which may further lead to the formation of a new species. Evolutionary transformations of the morphotype of trophocyte nuclei in species followed the scheme: from a local chromocenter in phylogenetically original species to its partial and then to its complete disappearance in derived species, while in a number of species chromosomes are dispersed in the nucleus and are in contact with the nuclear envelope.

The article contains 1 Figure, 33 References.

Keywords: mutual arrangement of chromosomes in trophocyte nuclei (morphotypes of nuclei), polytene chromosomes, *Drosophilidae*, species of *melanogaster* subgroup and *virilis* group, evolutionary cytogenetics

Fundings: The research was carried out within the framework of the state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project No. FSWM-2020-0019).

For citation: Wasserlauf IE, Usov KE, Abylkasymova GM, Sibataev AK. Evolutionary reorganization of chromosome interposition in the space of trophocyte nuclei in closely related *Drosophila* species. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2025;69:38-47. doi: 10.17223/19988591/69/5

Введение

Одной из проблем систематики и филогении является сложность в установлении видовой принадлежности в трудноопределяемых группах видов (криптические виды), которые фенотипически сходны друг с другом, но в то же время репродуктивно изолированы и отличаются по структуре геномов [1–3]. Для установления филогенетического родства между близкородственными видами, а также для установления таксономического статуса актуальными методами исследований являются гибридологический анализ, кариотипирование, изучение структуры хромосом, молекулярно-цитогенетические методы [4–6].

Для большинства двукрылых насекомых в ядрах клеток слюнных желез, трофоцитов, мальпигиевых сосудах характерно образование гигантских политенных хромосом с видоспецифичной дисковой и междисковой структурой [7–10]. Особенностью этих хромосом является то, что гомологичные хромосомы спарены друг с другом. По структуре хромосом виды различаются, и по этому признаку построены филогенетические деревья между близкородственными видами. В то же время есть виды, у которых структура политенных хромосом практически не отличается, такие виды называются гомосеквентными [8, 9]. Поэтому между этими видами сложно установить филогенетические взаимоотношения. Однако у малярийных комаров был обнаружен новый видовой признак (взаимное расположение хромосом в пространстве ядер трофоцитов), по которому различаются гомосеквентные виды [11–13]. В связи с этим представляло большой интерес изучение данного феномена у других двукрылых насекомых, особенно у гомосеквентных и у криптических видов.

Видовая специфичность взаимного расположения хромосом в ядрах трофоцитов

Изучение пространственной организации хромосом в ядрах трофоцитов близкородственных видов подгруппы *melanogaster* и группы *virilis* показало, что перераспределение прицентромерного гетерохроматина по плечам хромосом трофоцитов дрозофил либо его элиминация при видообразовании

сопровождается различными хромосомными перестройками, перемещением мобильных элементов по геному, с помощью которых может происходить реорганизация хромосом в пространстве ядер трофоцитов [13–20]. В результате эволюционных преобразований архитектуры ядер трофоцитов у близкородственных видов подгруппы *melanogaster* и группы *virilis* образовались четыре морфологических типа взаимного расположения хромосом в ядре: 1) с локальным хромоцентром; 2) с диффузным хромоцентром; 3) с отсутствием хромоцентра; 4) с прикреплениями хромосом прицентромерными районами к ядерной оболочке [21–23]. По-видимому, эти четыре морфологических типа организации ядер связаны с количеством гетерохроматина в прицентромерных районах хромосом [24]. Чем больше гетерохроматина в прицентромерных районах хромосом, как у филогенетически стволовых видов *D. orena*, *D. virilis* и *D. kanekoi*, тем больше вероятность образования хромоцентральной организации хромосом в ядре. Известно, что видоспецифичность по количеству и локализации гетерохроматина в геноме предполагает его адаптивную значимость [24–28].

Закономерность географического распределения видов дрозофил по признаку «морфотип ядер трофоцитов»

Разные виды дрозофил по своему географическому распространению на материках занимают свои ареалы в определенных климатических зонах [25]. На основании анализа литературных и собственных данных было изучено, как признак «морфотип ядер трофоцитов» коррелирует с географическим распределением видов [8, 9, 16, 23, 25]. Это необходимо для того, чтобы установить закономерность эволюционного преобразования морфотипов ядер трофоцитов у дрозофил, зависимо не только от внутренних факторов, но и от внешних факторов среды обитания. С учетом литературных данных по географическому распространению видов дрозофил, по данным пищевых предпочтений мух, данных по инверсионному полиморфизму, а также наших данных по морфотипам ядер трофоцитов нами был проведен анализ возможного эволюционного преобразования архитектуры ядер трофоцитов у видов подгруппы *melanogaster* и группы *virilis* [16, 23].

Было установлено, что виды эндемики (реликтовые, филогенетически стволовые виды *D. orena*, *D. virilis*), ареалы которых занимают горные районы на высоте 2100–1609 м над уровнем моря имеют хромоцентральной организацию ядер трофоцитов [24]. Следует отметить, что температурный режим в горных районах колеблется от +8°C ночью до +16°C днем. Такая температура для развития дрозофилы достаточно чувствительная [25]. Известно, что у особей, обитающих в экстремальных условиях, например, в популяциях северных широт, где температуры окружающей среды достигают экстремального уровня, происходит изменение количества и локализации гетерохроматина в хромосомах [26, 27]. Вероятно, поэтому у стволовых видов *D. orena* и *D. virilis*, обитающих в высокогорье при пониженных температурах, содержится в геноме большое количество гетерохроматина в

хромосомах [29, 30], что свидетельствует об адаптивном значении гетерохроматина.

Другие виды мух, ареалы которых распространены на больших территориях возвышенности и равнин от 0–1300 м над уровнем моря с наиболее оптимальными климатическими условиями при температуре, достигающей +28°C, содержат в геноме гетерохроматина меньше, чем стволовые виды [31–32], и поэтому их морфотип ядер трофоцитов не имеет хромоцентральной организации. Отсюда следует, что филогенетически древние стволовые виды с высоким содержанием гетерохроматина в геноме и хромоцентральной организацией ядер трофоцитов, как правило, обитают в суровых высокогорных климатических условиях окружающей среды [7, 8]. В то время как виды с меньшим количеством гетерохроматина в геноме и с хромосомами, рассредоточенными в пространстве ядер трофоцитов, обитают в наиболее благоприятном тропическом климате.

Таким образом, при видообразовании экстремальная температура могла являться одним из важных факторов воздействия окружающей среды на реорганизацию хромосом в пространстве ядер трофоцитов у дрозофил. Кроме того, по-видимому, инбридинг характерный для популяций видов, распространенных на периферии ареала, мог также повлиять на архитектуру ядер трофоцитов и привести к эволюционным преобразованиям пространственной организации хромосом в ядрах трофоцитов. В связи с этим нами был поставлен эксперимент с линиями *D. melanogaster*, который выявил, что низкая температура и продолжительный инбридинг оказывают влияние на организацию хромосом в ядрах трофоцитов [33].

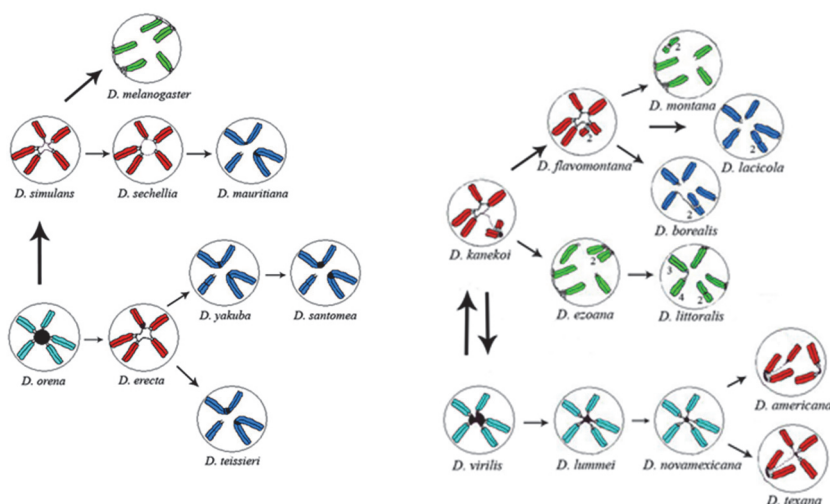


Рис. 1. Схема эволюционных преобразований морфотипов ядер трофоцитов у видов подгруппы *melanogaster* и видов группы *virilis*

[Fig. 1. The scheme of evolutionary transformations of morphotypes of trophocyte nuclei in species of the *melanogaster* subgroup and species of the *virilis* group]

Вероятно, при воздействии этих факторов на геном дрозофил видов подгруппы *melanogaster* и группы *virilis* происходило изменение количества гетерохроматина в прицентромерных районах хромосом (с помощью хромосомных перестроек и перемещения мобильных генетических элементов), что могло привести к изменению пространственной организации хромосом в ядре с образованием четырех морфологических типов ядра [23]. Эволюция генома дрозофил шла в сторону уменьшения количества гетерохроматина (в основном прицентромерного), что, по-видимому, привело к исчезновению хромоцентральной организации ядра у филогенетически производных видов дрозофил (см. рис. 1).

В филогенезе у дрозофил подгруппы *melanogaster* и группы *virilis* проявилась общая тенденция эволюционной реорганизации хромосом в пространстве ядер трофоцитов: от локального хромоцентра у стволовых видов, затем к диффузному хромоцентру и к его полному исчезновению у более молодых групп дрозофил [21, 23].

Заключение

Было показано, что выявленный признак – морфотип ядер трофоцитов, также как ранее выявленный у видов малярийных комаров, имеет видовую специфичность и у близкородственных видов дрозофил. Выявлена закономерность распределения видов подгруппы *melanogaster* и группы *virilis* по признаку «морфотип ядер трофоцитов», коррелирующая с центрами происхождения видов и географическим распределением ареалов относительно уровня моря у видов дрозофил.

Список источников

1. Dobzhansky T. Genetics and the Origin of Species. New York : Columbia University, 1937. 234 p.
2. Лухтанов В.А. Делиминация видов и анализ криптического видового разнообразия в XXI веке // Энтомологическое обозрение. 2019. № 2. С. 358–370.
3. Феоктистова Н.Ю., Кропоткина М.В., Поташникова Е.В., Гуреева А.В., Кузнецова Е.В. Видообразование у аллопатрических видов хомячков подсемейства Cricetinae (Rodentia, Cricetinae) // Журнал общей биологии. 2018. Т. 79, № 4. С. 262–276.
4. Стегний В.Н., Шарахова М.В. Системная реорганизация архитектоники политенных хромосом в онто- и филогенезе малярийных комаров. Структурные особенности зон прикрепления хромосом к ядерной оболочке // Генетика. 1991. Т. 27, № 5. С. 828–835.
5. Игнатов М.С., Кузнецова О.И., Игнатова Е.А. Гибридизация мхов, насколько отдаленной может быть // Журнал общей биологии. 2018. Т. 79. С. 159–166.
6. Sharakhova M.V., Timoshevskiy V.A., Yang F., Demin S.Iu., Severson D.W., Sharakhov I.V. Imaginal discs – a new source of chromosomes for genome mapping of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* // PLoS Negl Tropical Disease. 2011. Vol. 5, № 10. e1335. doi: 10.1371/journal.pntd.0001335.
7. Coluzzi M. Sibling species in Anopheles and their importance in malariology // Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America. 1970. Vol. 7, № 1. PP. 62–77. doi: 10.4182/TTUI3308.7-1.63

8. Lemeunier F., Ashburner M. Relationships within the melanogaster species subgroup of the genus *Drosophila* (Sophophora) // Proceedings of the Royal Society B. 1976. Vol. 193. PP. 275–294.
9. Lemeunier F., Ashburner M. Relationships within the melanogaster species subgroup of the genus *Drosophila* (Sophophora). IV. The chromosomes of two new species // Chromosoma. 1984. Vol. 89. PP. 343–351.
10. Lachaise D. Evolutionary novelties in islands: *Drosophila santomea*, a new melanogaster sister species from Sao Tome // Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 2000. Vol. 267, № 1452. PP. 1487–1495. doi: 10.1098/rspb.2000.1169
11. Стегний В.Н. Реорганизация структуры интерфазных ядер в онто- и филогенезе малярийных комаров // Доклады Академии наук СССР. 1979. Т. 249, № 5. С. 1231–1234.
12. Стегний В.Н. Системная реорганизация архитектоники политеменных хромосом в онто- и филогенезе малярийных комаров. II. Видоспецифичность в характере взаимоотношений хромосом с ядерной оболочкой в питательных клетках яйчников // Генетика. 19876. Т. 23, № 7. С. 1194–1198.
13. Стегний В.Н. Генетика салтационного видообразования и системные мутации. Томск : Издательский Дом Томского государственного университета, 2019. 262 с.
14. Евгеньев М.Б. Изучение конъюгации политеменных хромосом у межвидовых гибридов *Drosophila* группы *virilis*. Равнозначность участков хромосомы в отношении конъюгации // Цитология. 1975. Т. 17, № 10. С. 1128–1131.
15. Корочкин Л.И. Эволюционное значение генетических подвижных элементов. Гипотеза // Цитология и генетика. 1983. Т. 17. С. 67–78.
16. Вассерлауф И.Э. Динамика ориентации хромосом в ядрах трофобластов яйчников у близкородственных видов подгруппы *D. melanogaster* и группы *D. virilis* // Вестник ТГУ. 2008. № 313. С. 205–214.
17. Усов К.Е., Шелковникова Т.А., Вассерлауф И.Э., Стегний В.Н. Молекулярно-цитогенетический анализ прицентромерного гетерохроматина хромосом трофобластов яйчников у видов подгруппы *melanogaster* рода *Drosophila* // Цитология. 2008. Т. 50, № 12. PP. 1043–1047.
18. Usov K.E., Wasserlauf I.E., Abylkasymova G.M., Stegny V.N. Species specificity of DNA localization from the near-centromeric heterochromatin on polytene chromosomes in salivary gland cells and in 3D-organization of trophocyte nuclei in *Drosophila virilis* and *Drosophila kanekoi* (Diptera: Drosophilidae) // Genetics. 2014. Т. 50, № 11. PP.1299–1304.
19. Wasserlauf I., Usov K., Artemov G., Anan'ina T., Stegny V. Specific features in linear and spatial organizations of pericentromeric heterochromatin regions in polytene chromosomes of the closely related species *Drosophila virilis* and *D. kanekoi* (Diptera: Drosophilidae) // Genetica. 2015. Vol. 143, № 3. PP. 331–342. doi: 10.1007/s10709-015-9832-7
20. Mérel V., Boulesteix M., Fablet M., Vieira C. Transposable elements in *Drosophila* // Mobile DNA. 2020. Vol. 11, № 23. PP. 2–20. doi: 10.1186/s13100-020-00213-z.
21. Стегний В.Н., Вассерлауф И.Э. Видовая архитектура хромосом генеративной ткани и проблемы филогенетических отношений в подгруппе *melanogaster* рода *Drosophila* (Sophophora) // Генетика. 1994. Т. 30, № 4. С. 478–483.
22. Стегний В.Н., Вассерлауф И.Э., Ананьина Т.В. Взаиморасположение первичных политеменных хромосом яйчников у 12 видов группы «*virilis*» рода *Drosophila* (Sophophora) // Генетика. 1996. Т. 32, № 6. С. 750–754.
23. Wasserlauf I.E. Chromosome interposition in the nuclei of ovarian trophocytes in a number of Diptera: a monograph. LAP LAMBERT Academic Publishing : Deutschland, 2013. 300 p.
24. Lemeunier F., Dutrillaux B., Ashburner M. Relationships within the melanogaster subgroup species of the genus *Drosophila* (Sophophora). III. The mitotic chromosomes and quinacrine fluorescent patterns of the polytene chromosomes // Chromosoma. 1978. Vol. 69. PP. 349–361.
25. Lachaise D., Silvain J.-F. How two Afrotropical endemics made two cosmopolitan human commensals: the *Drosophila melanogaster*–*D. simulans* palaeogeographic riddle // Genetica. 2004. Vol. 120. PP. 17–39.

26. Кикнадзе И.И., Спирин М.Т., Филиппова М.А. Изменение массы прицентромерного гетерохроматина – один из важных путей эволюции у хирономид // Цитология. 1991. Т. 33, № 12. С. 90–98.
27. Baimai V. Heterochromatin accumulation and karyotypic evolution in some dipterian insects // Zoological studies. 1998. Vol. 37, № 2. PP. 75–88.
28. Lemeunier F., Dutrillaux B., Ashburner M. Relationships within the melanogaster subgroup species of the genus *Drosophila* (Sophophora). III. The mitotic chromosomes and quinacrine fluorescent patterns of the polytene chromosomes // Chromosoma. 1978. Vol. 69. PP. 349–361.
29. Craddock E.M., Gall J.G., Jonas M. Hawaiian *Drosophila* genomes: size variation and evolutionary expansions // Genetica. 2016. Vol. 144. PP. 107–124. doi: 10.1007/s10709-016-9882-5
30. Hjelmen C.E., Holmes V.R., Burrus C.G., Piron E., Mynes M., Garrett M.A., Blackmon H., Johnston J.S. Thoracic derreplication in *Drosophila* species estimates a minimum genome size and the dynamics of added DNA // Evolution. 2020. Vol. 74, № 7. PP. 1423–1436. doi: 10.1111/evo.1402215
31. Mahan J.T., Beck M.L. Heterochromatin in mitotic chromosomes of the virilis species group of *Drosophila* // Genetica. 1986. Vol. 68. PP. 113–118.
32. Throckmorton L.H. The virilis species group // The Genetics and Biology of *Drosophila*. London: Academic Press, 1982. Vol. 3b. PP. 227–296.
33. Вассерлауф И.Э., Шелковникова Т.А., Митренина Е.Ю., Стегний В.Н. Нарушения спаривания гомологичных хромосом в ядрах трофоцитов яичников *Drosophila melanogaster* при действии инбридинга и низкой температуры // Цитология. 2005. Т. 47, № 9. С. 798–799.

References

1. Dobzhansky T. Genetics and the Origin of Species. New York: Columbia University; 1937. 234 p.
2. Lukhtanov VA. Species delimitation and analysis of cryptic fork diversity in the XXI century. *Entomological Review*. 2019;(2):358-370. In Russian, English summary
3. Feoktistova NYu. Speciation in allopatric hamster species of the subfamily Cricetinae (Rodentia, Cricetinae). *Journal of General Biology*. 2018;79(4):262-276. In Russian, English summary
4. Stegnii VH, Sharakhova MV. Systemic reorganization of polytene chromosome architectonics in onto- and phylogeny of malaria mosquitoes. Structural features of chromosome attachment zones to the nuclear envelope. *Russian Journal of Genetics*. 1991;27(5):828-835. In Russian, English summary
5. Ignatov MS, Kuznetsova OI, Ignatova EA. Hybridization of mosses, how remote it can be. *Zhurnal General Biology*. 2018;79:159-166. In Russian, English summary
6. Sharakhova MV, Timoshevskiy VA, Yang F, Demin Slu, Severson DW, Sharakhov IV. Imaginal discs – a new source of chromosomes for genome mapping of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Tropical Disease*. 2011;5(10):e1335. doi: 10.1371/journal.pntd.0001335. Epub 2011 Oct 4.
7. Coluzzi M. Sibling species in Anopheles and their importance in malariology. *Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America*. 1970;7(1):62-77. doi: 10.4182/TTUI3308.7-1.63
8. Lemeunier F, Ashburner M. Relationships within the melanogaster species subgroup of the genus *Drosophila* (Sophophora). *Proceedings of the Royal Society B*. 1976;193:275-294.
9. Lemeunier F, Ashburner M. Relationships within the melanogaster species subgroup of the genus *Drosophila* (Sophophora). IV. The chromosomes of two new species. *Chromosoma*. 1984;89:343-351.
10. Lachaise D. Evolutionary novelties in islands: *Drosophila santomea*, a new melanogaster sister species from Sao Tome. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2000;267(1452):1487-1495. doi: 10.1098/rspb.2000.1169

11. Stegnii VN. Reorganization of the structure of interphase nuclei in ontogeny and phylogeny of malaria mosquitoes. *Dokl. of the USSR Academy of Sciences*. 1979;249(5):1231-1234. In Russian, English summary
12. Stegnii VN. Systemic reorganization of polytene chromosome architectonics in ontogeny and phylogeny of malarial mosquitoes. II. Species specificity in the nature of relationships between chromosomes and nuclear envelope in ovarian feeding cells. *Russian Journal of Genetics*. 1987;23(7):1194-1198.
13. Stegnii VN. *Genetika sal'tsionnogo vidoodobrazovaniya i sistemnye mutatsii* [Genetics of saltation speciation and systemic mutations]. Tomsk: Publishing House of Tomsk State University; 2019. 262 p. In Russian
14. Evgeniev MB. Study of polytene chromosome conjugation in interspecific hybrids of *Drosophila virilis* group. Equivalence of chromosome sections with respect to conjugation. *Cytology*. 1975;17(10):1128-1131. In Russian, English summary
15. Korochkin LI. Evolutionary significance of genetic mobile elements. A hypothesis. *Cytology and Genetics*. 1983;17:67-78. In Russian, English summary
16. Wasserlauf IE. Dynamics of chromosome orientation in the nuclei of ovarian trophocytes in closely related species of the *D. melanogaster* subgroup and the *D. melanogaster* group. *melanogaster* and *D. virilis*. *Bulletin of Tomsk State University*. 2008;313:205-214. In Russian, English summary
17. Usov KE, Shelkovnikova TA, Wasserlauf IE, Stegnii VN. Molecular cytogenetic analysis of near-centromeric heterochromatin of ovarian trophocyte chromosomes in species of the *melanogaster* subgroup of the genus *Drosophila*. *Cytology*. 2008;50(12):1043-1047. In Russian, English summary
18. Usov KE, Wasserlauf IE, Abylkasymova GM, Stegniy VN. Species specificity of DNA localization from the near-centromeric heterochromatin on polytene chromosomes in salivary gland cells and in 3D-organization of trophocyte nuclei in *Drosophila virilis* and *Drosophila kanekoi* (Diptera: Drosophilidae). *Russian Journal of Genetics*. 2014;50(11):1299-1304. In Russian, English summary
19. Wasserlauf I, Usov K, Artemov G, Anan'ina T, Stegniy V. Specific features in linear and spatial organizations of pericentromeric heterochromatin regions in polytene chromosomes of the closely related species *Drosophila virilis* and *D. kanekoi* (Diptera: Drosophilidae). *Genetica*. 2015;143(3):331-342. doi: 10.1007/s10709-015-9832-7
20. Mérel V, Boulesteix M, Fablet M, Vieira C. Transposable elements in *Drosophila*. *Mobile DNA*. 2020;11(23):2-20. doi: 10.1186/s13100-020-00213-z.
21. Stegnii VN, Wasserlauf IE. Species-specific chromosome architectonics of generative tissue and problems of phylogenetic relationships in the *melanogaster* subgroup of the genus *Drosophila* (Siphonophora). *Russian Journal of Genetics*. 1994;30(4):478-483. Russian, English summary
22. Stegnii VN, Wasserlauf IE, Ananyina TV. Interlocation of primary polytene chromosomes of ovaries in 12 species of the group "virilis" of the genus *Drosophila* (Siphonophora). *Russian Journal of Genetics*. 1996;32(6):750-754. Russian, English summary
23. Wasserlauf IE. Chromosome interposition in the nuclei of ovarian trophocytes in a number of Diptera: a monograph. LAP LAMBERT Academic Publishing; Deutschland, 2013. 300 p.
24. Lemeunier F, Dutrillaux B, Ashburner M. Relationships within the *melanogaster* subgroup species of the genus *Drosophila* (Siphonophora). III. The mitotic chromosomes and quinacrine fluorescent patterns of the polytene chromosomes. *Chromosoma*. 1978;69:349-361.
25. Lachaise D, Silvain J-F. How two Afrotropical endemics made two cosmopolitan human commensals: the *Drosophila melanogaster*-*D. simulans* palaeogeographic riddle. *Genetica*. 2004;120:17-39.
26. Kiknadze II, Spirin MT, Filipova MA. Change in the mass of the centromeric heterochromatin is one of the important evolutionary pathways in chironomids. *Cytology*. 1991;33(12):90-98. Russian, English summary
27. Baimai V. Heterochromatin accumulation and karyotypic evolution in some dipterian insects. *Zoological studies*. 1998;37(2):75-88.

28. Lemeunier F, Dutrillaux B, Ashburner M. Relationships within the melanogaster subgroup species of the genus *Drosophila* (Sophophora). III. The mitotic chromosomes and quinacrine fluorescent patterns of the polytene chromosomes. *Chromosoma*. 1978;69:349-361.
29. Craddock EM, Gall JG, Jonas M. Hawaiian *Drosophila* genomes: size variation and evolutionary expansions. *Genetica*. 2016;144:107-124. doi: 10.1007/s10709-016-9882-5
30. Hjelmen CE, Holmes VR, Burrus CG, Piron E, Mynes M, Garrett MA, Blackmon H, Johnston JS. Thoracic derreplication in *Drosophila* species estimates a minimum genome size and the dynamics of added DNA. *Evolution*. 2020;74(7):1423-1436. doi: 10.1111/evo.1402215.
31. Mahan JT, Beck ML. Heterochromatin in mitotic chromosomes of the virilis species group of *Drosophila*. *Genetica*. 1986;68:113-118.
32. Throckmorton LH. The virilis species group. *The Genetics and Biology of Drosophila*. London: Academic Press. 1982;3b:227-296.
33. Wasserlauf IE, Shelkovnikova TA, Mitrenina EYu, Stegnii VN. Disturbances of homologous chromosome pairing in the nuclei of ovarian trophocytes of *Drosophila melanogaster* at inbreeding and low temperature. *Cytology*. 2005;47(9):798-799. Russian, English summary

Информация об авторах:

Вассерлауф Ирина Эгоновна, с.н.с. НИЛ биологии и почвоведения Томского государственного университета (Томск, Россия).

E-mail: irinawasserlauf@mail.ru

Усов Константин Евгеньевич, доцент кафедры генетики и клеточной биологии Томского государственного университета (Томск, Россия).

E-mail: usovke@rambler.ru

Абылкасымова Гульнар Мухтаргазыевна, н.с. лаборатории молекулярной генетики Института генетики и физиологии (Алматы, Казахстан).

E-mail: iggc@mail.ru

Сибатаев Ануарбек Каримович, зав. кафедрой биологии, защиты и карантина растений Казахского агротехнического исследовательского университета им. С.С. Сейфуллина (Астана, Казахстан).

E-mail: a.sibataev@kazatu.edu.kz

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Information about the authors:

Irina E. Wasserlauf, Senior Research, Laboratory of Biology and Soil Science, Tomsk State University (Tomsk, Russia).

E-mail: irinawasserlauf@mail.ru

Konstantin E. Usov, Associate Professor, Department of Genetics and Cell Biology, Tomsk State University (Tomsk, Russia).

E-mail: usovke@rambler.ru

Gulnar M. Abylkasymova, Researcher, Laboratory of Molecular Genetics, Institute of Genetics and Physiology (Almaty, Kazakhstan).

E-mail: iggc@mail.ru

Anuarbek K. Sibataev, Head of the Department of Biology, Plant Protection and Quarantine, Kazakh Agrotechnical Research University named after S.S. Seifullin (Astana, Kazakhstan).

E-mail: a.sibataev@kazatu.edu.kz

The Authors declare no conflict of interest.

*Статья поступила в редакцию 25.08.2024;
одобрена после рецензирования 20.11.2024; принята к публикации 03.03.2025.*

*The article was submitted 25.08.2024;
approved after reviewing 20.11.2024; accepted for publication 03.03.2025.*

Научная статья

УДК 577.218

doi: 10.17223/19988591/69/6

Подходы к анализу событий альтернативного сплайсинга в децидуальных клетках плаценты человека

**Мария Михайловна Гавриленко¹, Екатерина Александровна Трифонова²,
Анастасия Александровна Бабовская³, Алексей Андреевич Зарубин⁴,
Мария Геннадьевна Сваровская⁵, Екатерина Владимировна Ижойкина⁶,
Вадим Анатольевич Степанов⁷**

*1, 2, 3, 4, 5, 7 Научно-исследовательский институт медицинской генетики
Томского национального исследовательского медицинского центра,
Российская академия наук, Томск, Россия*

⁶ СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия

⁶ Областной перинатальный центр им. И.Д. Евтушенко, Томск, Россия

¹ maria.gavrilenko@medgenetics.ru

² ekaterina.trifonova@medgenetics.ru

³ anastasia.babovskaya@medgenetics.ru

⁴ aleksei.zarubin@medgenetics.ru

⁵ maria.swarovskaja@medgenetics.ru

⁶ katushkabig@mail.ru

⁷ genetics@tnimc.ru

Аннотация. Альтернативный сплайсинг мРНК – ключевой этап посттранскрипционной регуляции экспрессии генов, который обеспечивает экспрессию различных изоформ РНК. Этот механизм играет важную роль в развитии и функционировании плаценты. В качестве объекта исследования выбраны децидуальные клетки, которые имеют ключевую роль как в поддержании физиологической беременности, так и в развитии акушерских осложнений. В исследовании проведено глубокое РНК секвенирование с детальным анализом событий альтернативного сплайсинга в плацентарной ткани при физиологическом течении беременности. Для анализа аннотированных классических событий альтернативного сплайсинга использованы программы MAJIQ, rMATS, SGSeq. В децидуальных клетках идентифицировано с помощью программы MAJIQ 3 501 аннотированное бинарное событие АС для 2 731 генов; с помощью программы rMATS – 66 687 событий для 14 784 генов; с помощью программы SGSeq – 15 782 события для 5 616 генов. Идентифицировано 15 887 экспрессирующихся в плаценте и подверженных альтернативному сплайсингу, из которых 1 857 генов являются общими по результатам трех различных программ. Анализ реконструированной генной сети позволил выявить регуляторные связи, обеспечивающие координированную экспрессию большинства центральных генов, которые ассоциированы с иммунной системой, клеточной миграцией, межклеточными контактами и регуляцией экспрессии. Полученные результаты подтверждают важность альтернативного сплайсинга, который существенно увеличивает транскрипционное разнообразие и представляет собой значимый механизм регуляции генов в децидуальных клетках.

Ключевые слова: альтернативный сплайсинг, полнотранскриптомное секвенирование, плацента, децидуальные клетки, MAJIQ, rMATS, SGSeq

Источник финансирования: работа выполнена за счет средств государственного задания по теме ФНИ № 122020200083-8.

Для цитирования: Гавриленко М.М., Трифонова Е.А., Бабовская А.А., Зарубин А.А., Сваровская М.Г., Ижойкина Е.В., Степанов В.А. Подходы к анализу событий альтернативного сплайсинга в децидуальных клетках плаценты человека // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2025. № 69. С. 48–57. doi: 10.17223/19988591/69/6

Original article

doi: 10.17223/19988591/69/6

Approaches to the analysis of alternative splicing events in human placental decidual cells

**Maria M. Gavrilenko¹, Ekaterina A. Trifonova², Anastasia A. Babovskaya³,
Aleksey A. Zarubin⁴, Maria G. Swarovskaya⁵, Ekaterina V. Izhoikina⁶,
Vadim A. Stepanov⁷**

*^{1, 2, 3, 4, 5, 7} Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center,
Tomsk, Russia*

*⁶ Siberian State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation,
Tomsk, Russia*

⁶ Regional Perinatal Center named after I.D. Evtushenko, Tomsk, Russia

¹ maria.gavrilenko@medgenetics.ru

² ekaterina.trifonova@medgenetics.ru

³ anastasia.babovskaya@medgenetics.ru

⁴ aleksei.zarubin@medgenetics.ru

⁵ maria.swarovskaja@medgenetics.ru

⁶ katushkabig@mail.ru

⁷ genetics@tnimc.ru

Summary. The alternative splicing study (AS) is of considerable interest to researchers, since this process is fundamental in molecular biology and leads to the expression of various protein isoforms from a single gene. Alternative splicing is known to regulate the expression of genes involved in the development and functioning of the placenta. It is known that one of the decisive events for the successful implantation of the embryo and the development of the placenta is the differentiation of endometrial stromal cells into decidual cells, which play a key role both in maintaining physiological pregnancy, in this regard, they are the most interesting object for the study of AS events during pregnancy. The aim of the study is to analyze and characterize the events of alternative splicing in decidual cells during physiological pregnancy.

MAJIQ, rMATS, and SGSeq programs are selected for the analysis of AS events. Thus, in the total array of the control group, 3501 annotated AS events for 2731 genes were identified using the MAJIQ; 66687 events for 14784 genes were identified using the rMATS; 15782 events for 5616 genes were identified using the SGSeq. The next step was to classify all events according to 7 types of AS for the MAJIQ and SGSeq, and 5 types of events for the rMATS (See Fig. 1). When searching for common genes, low replication of the results was shown (33.9%), since only 5,387 genes were identified in at least two programs at the same time.

In order to provide a more detailed functional annotation of genes affected by AS, 1857 genes common to all three programs were analyzed (See Fig. 2). The analysis of the protein-protein network reconstructed using the "STRING" program included 386

protein products (high confidence = 0.999) and 98 clusters. These genes are associated with chromatin modification, transcription regulation, intercellular signaling, cell migration, intercellular adhesion, immune system, apoptosis, and the NF-kappaB signaling pathway according to the detailed functional annotation in the GeneOntology, KEGG, Reactome databases. These signaling pathways are crucial for the development and maintenance of fetal health and their violation can lead to various obstetric pathologies, in connection with which it seems relevant to further study this mechanism of RNA processing in a cohort of patients with obstetric pathology.

The article contains 2 Figures, 12 References.

Keywords: alternative splicing, whole transcriptome sequencing, placenta, decidual cells, MAJIQ, rMATS, SGSeq

Funding: This work was supported by the state assignment (fundamental scientific research No. 122020200083-8).

For citation: Gavrilenko MM, Trifonova EA, Babovskaya AA, Zarubin AA, Swarovskaya MG, Izhoikina EV, Stepanov VA. Approaches to the analysis of alternative splicing events in human placental decidual cells. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya* = Tomsk State University Journal of Biology. 2025;69:48-57. doi: 10.17223/19988591/69/6

Введение

Изучение альтернативного сплайсинга (АС) представляет значительный интерес для исследователей, поскольку данный процесс является фундаментальным в молекулярной биологии, в ходе которого одна пре-мессенджерная РНК (пре-мРНК) может быть сплайсирована различными способами для получения множества транскриптов мРНК, что приводит к экспрессии различных изоформ белка из одного гена. Известно, что 95% генов подвержено альтернативному сплайсингу [1].

По своей сути альтернативный сплайсинг предполагает избирательное включение или исключение экзонов (кодирующих областей) и/или интронов (некодирующих областей) в процессинге мРНК. Существует несколько классических (бинарных) типов событий АС [2], каждый из которых приводит к различным изоформам мРНК: альтернативные 3'- и 5'-сайты сплайсинга, альтернативные первый и последний экзоны, взаимоисключающий сплайсинг экзонов, удержание интрона, пропуск экзона.

Известно, что альтернативный сплайсинг регулирует экспрессию генов, участвующих в развитии и функционировании плаценты. Изменение экспрессии плацентарных генов может нарушить такие важные процессы, как дифференцировка трофобласта, ангиогенез, транспорт питательных веществ и иммунный гомеостаз, что может привести к осложнениям беременности [3, 4]. Несмотря на всесторонний анализ альтернативного сплайсинга пре-мРНК во многих тканях и клетках человека в норме и при патологии, ранее не проводился глобальный скрининг изменений альтернативного сплайсинга в отдельных клеточных популяциях плацентарной ткани. Децидуальные клетки (ДК) плаценты играют ключевую роль как в поддержании физиологической беременности, так и при развитии ее неблагоприятных ис-

ходов, предположительно данные функции связаны с их участием в процессах гемостаза, воспалении и иммунном ответе [5]. В связи с этим ДК являются наиболее интересным объектом для исследования событий АС при беременности.

Немаловажным является выбор биоинформатического инструмента для анализа событий АС. Двумя распространенными типами биоинформатического анализа альтернативного сплайсинга являются анализ на основе изоформ и анализ на основе событий [6]. Анализ на основе событий фокусируется на выявлении и количественной оценке конкретных событий АС, таких как пропуск экзона, альтернативные 5'- или 3'-сайты сплайсинга, удержание интрона, альтернативные первый и последний экзоны и взаимоисключающие экзоны. В данном случае обычно используются такие инструменты, как MAJIQ [7], rMATS [8], SGSeq [9]. Методы анализа, основанные на событийном подходе, обладают более высокой чувствительностью и специфичностью для выявления событий АС даже при низких уровнях экспрессии благодаря точной количественной оценке считываний сплайсинговых соединений или уровней включения экзонов.

Цель исследования заключается в сравнении подходов к анализу событий альтернативного сплайсинга в децидуальных клетках при физиологической беременности.

Материалы и методы

Глубокое секвенирование проведено для 8 образцов плацентарной ткани, полученной от женщин с физиологическим течением беременности. Средний возраст составил $29,5 \pm 5,8$ года. Срезы плацентарной ткани охарактеризованы гистологически с окрашиванием гематоксилин-эозином. Лазерная микродиссекция осуществлена на оборудовании PALM «Carl Zeiss» (Германия) с технологией автоматизированного захвата фрагментов «Laser Capture Microdissection». Из полученных на диссекторе отдельных клеток выделена РНК для создания РНК-библиотек. Для выделения тотальной РНК использован набор Single Cell RNA Purification Kit «Norgen» (Канада). Концентрация и качество РНК оценены с помощью 2100 Bioanalyzer «Agilent» (США). Приготовление библиотек проведено по протоколу SMARTer Stranded Total RNA-Seq Kit v2 «Takara» (Япония). Массовое параллельное секвенирование проведено в режиме двухконцевого прочтения (2x100 п.о.) на приборе Next-seq 2000 «Illumina» (США). Расчетное число прочтений на образец составляло не менее 60 млн.

Предобработка данных проведена с помощью общепринятых подходов. Анализ качества полученных сиквенсов выполнен с помощью программы FastQC. Последовательности адаптеров удалены с помощью программы Trimmomatic. Выравнивание полученных транскриптомных данных на референсный геном человека (GRCh38) выполнено с помощью программы STAR. Анализ событий АС проведен с помощью программ MAJIQ, rMATS, SGSeq.

Результаты исследования и обсуждение

Для анализа событий альтернативного сплайсинга выбраны программы MAJIQ, rMATS, SGSeq, так как они существенно обновлены в 2023–2024 гг. и имеют возможность визуализации. Сам анализ был сосредоточен на аннотированных классических событиях, так как при предварительном анализе их оказалось большинство.

Таким образом, в общем массиве контрольной группы с помощью программы MAJIQ идентифицировано 3 501 аннотированное бинарное событие AC для 2 731 гена; с помощью программы rMATS идентифицированы 66 687 событий для 14 784 генов; с помощью программы SGSeq – 15 782 события для 5 616 генов. Разное количество идентифицированных событий и генов связано с разными подходами, заложенными разработчиками в программы для анализа альтернативного сплайсинга. Следующим шагом все бинарные события были классифицированы согласно 7 типам событий AC для программ MAJIQ и SGSeq и 5 типам событий для программы rMATS – количество рассчитано в процентах от общего числа событий (рис. 1).

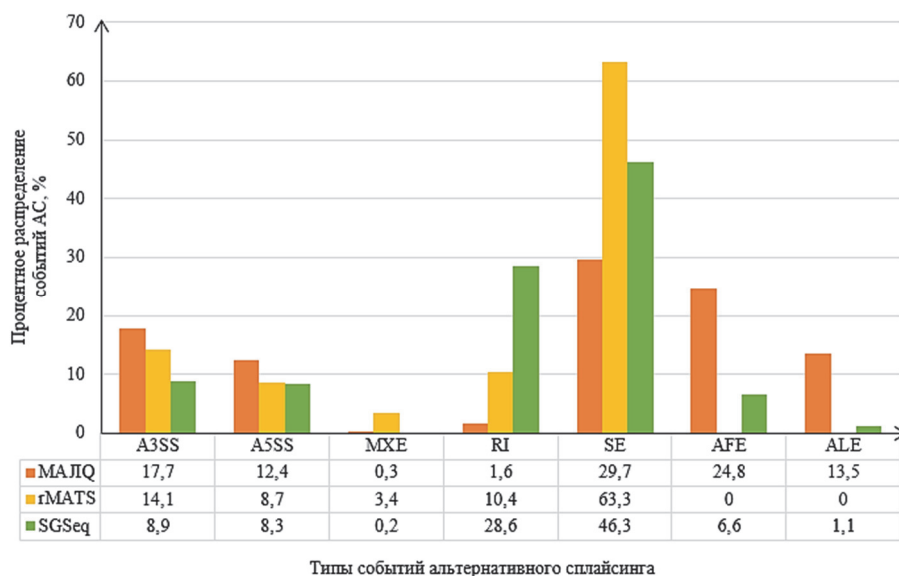


Рис. 1. Распределение аннотированных событий альтернативного сплайсинга в группе женщин с физиологической беременностью (A3SS – альтернативный 3'-сайт сплайсинга; A5SS – альтернативный 5'-сайт сплайсинга; MXE – взаимноисключающие экзоны; RI – удержание интрона; SE – пропуск экзона; AFE – альтернативный первый экзон; ALE – альтернативный последний экзон; – в программе rMATS события AFE и ALE не определяются). По оси X – тип событий AC; по оси Y – процентное соотношение для каждого типа событий

[Fig. 1. Distribution of annotated alternative splicing events in a group of women with physiological pregnancy (A3SS - alternative 3'-splicing site; A5SS - alternative 5'-splicing site; MXE - mutually exclusive exons; RI - intron retention; SE - exon skipping; AFE - alternative first exon; ALE - alternative last exon; - AFE and ALE events are not defined in the rMATS program). On the X-axis - type of AS events; on the Y-axis - the percentage per event type]

Из приведенных данных видно, что наиболее распространенным типом АС является пропуск экзона, что показано для всех трех программ, что согласуется с уже давно известным положением о преобладании пропуска экзона у млекопитающих. Далее мы можем наблюдать вариативность. В программе MAJIQ альтернативный первый экзон является вторым по распространенности событием АС, в rMATS – альтернативный 3'-сайт сплайсинга, тогда как в SGSeq – удержание интрона, что подтверждается новыми данными о росте событий удержания интрона [10]. Наименее редким событием являются взаимоисключающие экзоны, что также показано по результатам анализа данных всеми тремя программами. Следующим шагом для этой задачи являлся поиск пересекающихся генов среди всего массива данных (рис. 2).

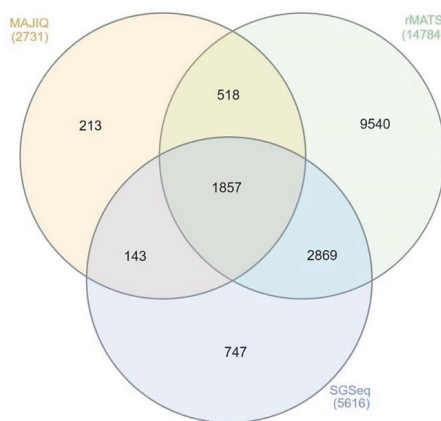


Рис. 2. Диаграмма Венна, демонстрирующая общность и специфичность генов, подверженных альтернативному сплайсингу и выявленных с помощью программ MAJIQ, rMATS, SGSeq

[Fig. 2. Venn diagram demonstrating the generality and specificity of genes subject to alternative splicing and identified using MAJIQ, rMATS, SGSeq programs]

При анализе результатов полученных данных важно отметить, что количество генов, подверженных АС, значительно варьировало (от 2 731 до 14 784). Идентифицировано 15 887 генов, экспрессирующихся в плаценте и подверженных альтернативному сплайсингу. При поиске общих генов показана низкая репликация результатов (33,9%), так как всего 5 387 генов выявлены хотя бы в двух программах одновременно. Низкая репликация может быть связана с различными статистическими и алгоритмическими подходами в используемых программах, кратко описанных выше.

В целях более детальной функциональной аннотации генов, подверженных АС, был проведен анализ 1 857 общих для всех трех программ генов. Анализ реконструированной с использованием программы «STRING» белок-белковой сети включал в себя 386 белковых продуктов (high confidence = 0,999) и 98 кластеров, из которых 8 кластеров включали в себя 8 и более генов, 57 кластеров по 2 гена, количество генов в остальных кластерах

варьировалось от 3 до 5 включительно. Согласно подробной функциональной аннотации в базах данных GeneOntology, KEGG, Reactome с помощью онлайн-ресурса WebGestalt (<https://www.webgestalt.org/>), эти гены связаны с модификацией хроматина, регуляцией транскрипции, межклеточным сигналингом, миграцией клеток, межклеточной адгезией, иммунной системой, апоптозом и сигнальным путем NF- κ B. Эти сигнальные пути имеют решающее значение для развития и поддержания здоровья плода, и их нарушение может привести к различным акушерским патологиям [11, 12], в связи с чем представляется актуальным дальнейшее изучение данного механизма процессинга РНК в когорте пациенток с акушерской патологией.

Заключение

В исследовании проведена оценка событий альтернативного сплайсинга в децидуальных клетках плаценты при физиологической беременности с помощью трех биоинформатических программ MAJIQ, rMATS, SGSeq. Согласно результатам анализа данных во всех трех подходах самым распространенным событием является пропуск экзона, а самым редким – взаимоисключающие экзоны, также выявлено 1 857 общих генов, подверженных альтернативному сплайсингу. Но продемонстрирована низкая репликация результатов, так как всего 5 387 генов (33,9%) выявлено хотя бы в двух программах одновременно. Это может быть связано с различными математическими подходами, заложенными разработчиками в алгоритмы программ, в связи с чем целесообразно использовать несколько подходов для идентификации событий АС и для последующего анализа выбирать те гены, которые являются общими для всех примененных в исследовании программ.

Список источников

1. Pan Q., Shai O., Lee L.J., Frey B.J., Blencowe B.J. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing // *Nature Genetics*. 2008. Vol. 40, № 12. PP. 1413–1415. doi: 10.1038/ng.259
2. Black D.L. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing // *Annual review of biochemistry*. 2003. Vol. 72, № 1. PP. 291–336. doi: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161720
3. Souders C.A., Maynard S.E., Yan J., Wang Y., Boatright N.K., Sedan J., Balyozian D., Cheslock P.S., Molrine D.C., Simas T.A. Circulating levels of sFlt1 splice variants as predictive markers for the development of preeclampsia // *International journal of molecular sciences*. 2015. Vol. 16, № 6. PP. 12436–12453. doi: 10.3390/ijms160612436
4. Dehghanian F., Hojati Z., Kay M. New insights into VEGF-A alternative splicing: key regulatory switching in the pathological process // *Avicenna journal of medical biotechnology*. 2014. Vol. 6, № 4. PP. 192–199.
5. Schatz F., Guzeloglu-Kayisli O., Arlier S., Kayisli U.A., Lockwood C.J. The role of decidual cells in uterine hemostasis, menstruation, inflammation, adverse pregnancy outcomes and abnormal uterine bleeding // *Human Reproduction Update*. 2016. Vol. 4. PP. 497–515. doi: 10.1093/humupd/dmw004
6. Mehmood A., Laiho A., Venäläinen M.S., McGlinchey A.J., Wang N., Elo L.L. Systematic evaluation of differential splicing tools for RNA-seq studies // *Briefings in bioinformatics*. 2020. Vol. 21, № 6. PP. 2052–2065. doi: 10.1093/bib/bbz126

7. Vaquero-Garcia J., Barrera A., Gazzara M.R., González-Vallinas J., Lahens N.F., Hogenesch J.B., Lynch K.W., Barash Y. A new view of transcriptome complexity and regulation through the lens of local splicing variations // *Elife*. 2016. Vol. 5. e11752. doi: 10.7554/eLife.11752
8. Shen S., Park J.W., Lu Z.X., Lin L., Henry M.D., Wu Y.N., Zhou Q., Xing Y. rMATS: robust and flexible detection of differential alternative splicing from replicate RNA-Seq data // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014. Vol. 111, № 51. E5593–E5601. doi: 10.1073/pnas.1419161111
9. Goldstein L.D., Ca Y., Pau G., Lawrence M., Wu T.D., Seshagiri S., Gentleman R. Prediction and quantification of splice events from RNA-seq data // *PloS One*. 2016. Vol. 11, № 5. e0156132. doi: 10.1371/journal.pone.0156132
10. Monteuuis G., Wong J.J., Bailey C.G., Schmitz U., Rasko J.E.J. The changing paradigm of intron retention: regulation, ramifications and recipes // *Nucleic acids research*. 2019. Vol. 47, № 22. PP. 11497–11513. doi: 10.1093/nar/gkz1068
11. Das J., Maitra A. Maternal DNA methylation during pregnancy: a review // *Reproductive Sciences*. 2021. Vol. 28, № 10. PP. 2758–2769. doi: 10.1007/s43032-020-00456-4
12. Barbitoff Y.A., Tsarev A.A., Vashukova E.S., Maksiutenko E.M., Kovalenko L.V., Belotserkovtseva L.D., Glotov A.S. A data-driven review of the genetic factors of pregnancy complications // *International journal of molecular sciences*. 2020. Vol. 21, № 9. 3384. doi: 10.3390/ijms21093384

References

1. Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nature Genetics*. 2008;40(12):1413-1415. doi: 10.1038/ng.259
2. Black DL. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annual review of biochemistry*. 2003;72(1):291-336. doi: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161720
3. Souders CA, Maynard SE, Yan J, Wang Y, Boatright NK, Sedan J, Balyozian D, Cheslock PS, Molrine DC, Simas TA. Circulating levels of sFlt1 splice variants as predictive markers for the development of preeclampsia. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(6):12436-12453. doi: 10.3390/ijms160612436
4. Dehghanian F, Hojati Z, Kay M. New insights into VEGF-A alternative splicing: key regulatory switching in the pathological process. *Avicenna journal of medical biotechnology*. 2014;6(4):192.
5. Schatz F, Guzeloglu-Kayisli O, Arlier S, Kayisli UA, Lockwood CJ. The role of decidual cells in uterine hemostasis, menstruation, inflammation, adverse pregnancy outcomes and abnormal uterine bleeding. *Human Reproduction Update*. 2016;4:497-515. doi: 10.1093/humupd/dmw004
6. Mehmood A, Laiho A, Venäläinen MS, McGlinchey AJ, Wang N, Elo LL. Systematic evaluation of differential splicing tools for RNA-seq studies // *Briefings in bioinformatics*. 2020;21(6):2052-2065. doi: 10.1093/bib/bbz126
7. Vaquero-Garcia J, Barrera A, Gazzara MR, González-Vallinas J, Lahens NF, Hogenesch JB, Lynch KW, Barash Y. A new view of transcriptome complexity and regulation through the lens of local splicing variations. *Elife*. 2016;5:e11752. doi: 10.7554/eLife.11752
8. Shen S, Park JW, Lu ZX, Lin L, Henry MD, Wu YN, Zhou Q, Xing Y. rMATS: robust and flexible detection of differential alternative splicing from replicate RNA-Seq data. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(51):E5593-E5601. doi: 10.1073/pnas.1419161111
9. Goldstein LD, Ca Y, Pau G, Lawrence M, Wu TD, Seshagiri S, Gentleman R. Prediction and quantification of splice events from RNA-seq data. *PloS One*. 2016;11(5):e0156132. doi: 10.1371/journal.pone.0156132

10. Monteuiis G, Wong JJ, Bailey CG, Schmitz U, Rasko JEJ. The changing paradigm of intron retention: regulation, ramifications and recipes. *Nucleic acids research*. 2019;47(22):11497-11513. doi: 10.1093/nar/gkz1068
11. Das J, Maitra A. Maternal DNA methylation during pregnancy: a review. *Reproductive Sciences*. 2021;28(10):2758-2769. doi: 10.1007/s43032-020-00456-4
12. Barbitoff YA, Tsarev AA, Vashukova ES, Maksiutenko EM, Kovalenko LV, Belotserkovtseva LD, Glotov AS. A data-driven review of the genetic factors of pregnancy complications. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(9):3384. doi: 10.3390/ijms21093384

Информация об авторах:

Гавриленко Мария Михайловна, м.н.с. лаборатории геномной идентификации и лаборатории эволюционной генетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (Томск, Россия). E-mail: maria.gavrilenko@medgenetics.ru

Трифоновна Екатерина Александровна, канд. мед. наук, с.н.с. лаборатории эволюционной генетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (Томск, Россия). E-mail: ekaterina.trifonova@medgenetics.ru

Бабовская Анастасия Александровна, канд. мед. наук, м.н.с. лаборатории геномной идентификации и лаборатории эволюционной генетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (Томск, Россия). E-mail: anastasia.babovskaya@medgenetics.ru

Зарубин Алексей Андреевич, канд. мед. наук, м.н.с. лаборатории популяционной генетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (Томск, Россия). E-mail: aleksei.zarubin@medgenetics.ru

Сваровская Мария Геннадьевна, канд. биол. наук, н.с. лаборатории эволюционной генетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (Томск, Россия). E-mail: maria.swarovskaja@medgenetics.ru

Ижойкина Екатерина Владимировна, ассистент кафедры акушерства и гинекологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Томск, Россия). E-mail: katushkabig@mail.ru

Степанов Вадим Анатольевич, академик РАН, д-р биол. наук, профессор, директор Томского НИМЦ (Томск, Россия). E-mail: genetics@tnimc.ru

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Information about the authors:

Maria M. Gavrilenko, junior researcher at the Laboratory of Genomic Identification of the Research Institute of Medical Genetics and the Laboratory of Evolutionary Genetics at the Research of the Tomsk Scientific Research Center (Tomsk, Russian Federation). E-mail: maria.gavrilenko@medgenetics.ru

Ekaterina A. Trifonova, Candidate of Medical Sciences, senior researcher at the Laboratory of Evolutionary Genetics of the Research Institute of Medical Genetics of the Tomsk Scientific Research Center (Tomsk, Russian Federation). E-mail: ekaterina.trifonova@medgenetics.ru

Anastasia A. Babovskaya, Candidate of Medical Sciences, junior researcher at the Laboratory of Genomic Identification and the Laboratory of Evolutionary Genetics at the Research Institute of Medical Genetics of the Tomsk Scientific Research Center (Tomsk, Russian Federation). E-mail: anastasia.babovskaya@medgenetics.ru

Alexey A. Zarubin, Candidate of Medical Sciences, junior researcher at the Laboratory of Population Genetics at the Research Institute of Medical Genetics of the Tomsk Scientific Research Center (Tomsk, Russian Federation). E-mail: aleksei.zarubin@medgenetics.ru

Maria G. Swarovskaja, Candidate of Biological Sciences, researcher at the Laboratory of Evolutionary Genetics of the Research Institute of Medical Genetics of the Tomsk Scientific Research Center (Tomsk, Russian Federation).

E-mail: maria.swarovskaja@medgenetics.ru

Ekaterina V. Izhojkina, assistant of the Department of Obstetrics and Gynecology, Siberian State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation (Tomsk, Russian Federation).

E-mail: katushkabig@mail.ru

Vadim A. Stepanov, Academician of the Russian Academy of Sciences, Doctor of Biological Sciences, Professor, Director of the Tomsk Scientific Research Center (Tomsk, Russian Federation).

E-mail: genetics@tnimc.ru

The Authors declare no conflict of interest.

*Статья поступила в редакцию 24.10.2024;
одобрена после рецензирования 24.11.2024; принята к публикации 03.03.2025.*

*The article was submitted 24.10.2024;
approved after reviewing 24.11.2024; accepted for publication 03.03.2025.*

Original article

УДК 575.13

doi: 10.17223/19988591/69/7

Современные представления об изменчивости митохондриального генома человека и ее роли в формировании фенотипа

Мария Владимировна Голубенко¹

¹ Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, Томск, Россия

¹ <https://orcid.org/0000-0002-7692-9954>, maria.golubenko@medgenetics.ru

Аннотация. Митохондриальная ДНК является небольшой, но важной и особенной частью генома. Исследования изменчивости мтДНК человека являются актуальными в различных аспектах. Цель исследования – обозначение основных современных направлений изучения митохондриальной ДНК человека, ее изменчивости и ее роли в формировании фенотипа. Современные работы по этой тематике направлены на анализ полной последовательности митохондриальной ДНК, а в последнее время большое значение приобретают исследования «древней» ДНК. Наследственный полиморфизм митохондриальной ДНК может иметь функциональное значение и вносить вклад в адаптацию к условиям жизненной среды, а также в предрасположенность к многофакторным заболеваниям. Изучение вклада полиморфизма митохондриальной ДНК в формирование фенотипа как в норме, так и при патологии сталкивается с проблемами оценки сочетанного эффекта нескольких вариантов. Роль полиморфизма мтДНК в предрасположенности к заболеваниям можно рассматривать в рамках гипотезы «экономных» генотипов. Таким образом, изучение полиморфизма митохондриальной ДНК в популяциях человека и при различных заболеваниях имеет как теоретическое, так и прикладное значение.

Ключевые слова: митохондриальная ДНК, *Homo sapiens*, популяционная генетика, полиморфизм, многофакторные заболевания

Источник финансирования: работа выполнена при поддержке гранта РНФ №24-24-00527.

Благодарности: автор искренне благодарен своим университетским учителям, преподавателям кафедры цитологии и генетики Томского государственного университета: Алле Анатольевне Козловой, Ларисе Ивановне Потехиной, Светлане Игоревне Цитленок, Светлане Васильевне Пулькиной, Юрию Михайловичу Новикову.

Для цитирования: Голубенко М.В. Современные представления об изменчивости митохондриального генома человека и ее роли в формировании фенотипа // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2025. № 69. С. 58–67. doi: 10.17223/19988591/69/7

Original article

doi: 10.17223/19988591/69/7

Modern concepts of the human mitochondrial genome variability and its role in the shaping of phenotype

Maria V. Golubenko¹

¹ *Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Science, Tomsk, Russian Federation*

¹ <https://orcid.org/0000-0002-7692-9954>, maria.golubenko@medgenetics.ru

Summary. Mitochondrial DNA (mtDNA) is a separate part of the genome which is localized in the mitochondria. It encodes 13 subunits of the respiratory chain complexes, as well as ribosomal and transfer RNAs. mtDNA is present in the cell in a large number of copies, its replication is relatively independent of the nuclear genome, it is inherited only through the maternal line, and has high mutation rate. The human mitochondrial genome has a high level of variability in various aspects, including hereditary polymorphism, which may have functional significance. High geographic and ethnic differentiation is characteristic of mtDNA polymorphism in human populations. In addition, mtDNA is characterized by different types of variability, such as the number of copies per cell and different levels of heteroplasmy of pathogenic variants. The purpose of this review is to outline the main trends in human mtDNA studies, its variability and its role in the shaping of phenotypes. Recently, mtDNA studies in populations have shifted to studying the complete mtDNA sequence, and studies of ancient DNA obtained from archaeological excavations are becoming increasingly important. Modern reproductive technologies and genome editing methods are being introduced in the field of mitochondrial diseases. Subunits of respiratory chain proteins encoded by mtDNA are more polymorphic in terms of amino acid sequence compared to subunits encoded by nuclear genes. Modern studies of associations of mtDNA polymorphism with phenotype are aimed at studying the effect of population genetic polymorphism on mitochondrial function, adaptation to environmental conditions, and studying the interaction of the effects of individual variants in one haplotype (epistasis). The study of the contribution of mtDNA polymorphism to the formation of a phenotype, both in health and pathology, faces the problems of assessing the combined effect of several variants. Recent studies have shown that the "genetic background" should be taken into account when assessing the pathogenicity/benignity of a genetic variant in mtDNA. For example, mtDNA belonging to haplogroup J is an unfavorable factor that enhances the effect of mtDNA mutations leading to the development of Leber's hereditary ophthalmopathy. The role of mtDNA polymorphism in predisposition to diseases can be considered within the framework of "thrifty" genotypes. This hypothesis assumes that the human genome is evolutionarily adapted to a traditional lifestyle, and modern changes in the level of human well-being and increased life expectancy lead to a change in the selection pressure, and evolutionarily formed genotypes lose their adaptiveness. In particular, this hypothesis is supported by the fact that mtDNA haplogroup H is associated with an increased risk of cardiovascular diseases, although it is the most common in human populations of European origin.

The article contains 26 References.

Keywords: Mitochondrial DNA, *Homo sapiens*, population genetics, polymorphism, common diseases

Fundings: This work was partially supported by Russian Science Foundation (Grant No 24-24-00527).

Acknowledgments: The author is sincerely grateful to her university teachers, lecturers of the Department of Cytology and Genetics of Tomsk State University: Alla Anatol'yevna Kozlova, Larisa Ivanovna Potekhina, Svetlana Igorevna Tsitlenok, Svetlana Vasilyevna Pulkina, Yuri Mikhailovich Novikov.

For citation: Golubenko MV. Modern concepts of the human mitochondrial genome variability and its role in the shaping of phenotype. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2025;69:58-67. doi: 10.17223/19988591/69/7

Введение

Митохондриальная ДНК (мтДНК) является особенной частью генома эукариотической клетки. Согласно современным представлениям, митохондриальная ДНК происходит от генома эндосимбионта – альфа-протеобактерии, ставшей предком митохондрий приблизительно 2 миллиарда лет назад [1]. В процессе эволюции подавляющее большинство генов эндосимбионта было перенесено в ядро, но до сих пор большинство митохондрий содержат ДНК, кодирующую транспортные и рибосомные РНК, а также некоторые субъединицы комплексов дыхательной цепи митохондрий. В частности, таких субъединиц тринадцать, генов рибосомных РНК – два, а генов транспортных РНК – двадцать два [1–2]. Митохондриальная ДНК человека стала одним из первых секвенированных геномов (1981); в настоящее время скорректированная версия этой последовательности [2] используется в качестве референса в полной последовательности генома человека.

Необычность мтДНК, обусловленная ее происхождением и локализацией, с одной стороны, и ключевое значение этой небольшой части генома, кодирующей жизненно важные белки, с другой стороны, обуславливают актуальность исследований митохондриального генома. Целью данного обзора является обозначение основных современных направлений изучения мтДНК человека, ее изменчивости и роли в формировании фенотипа.

Аспекты изменчивости митохондриального генома

Особенности мтДНК по сравнению с ядерными генами заключаются прежде всего в том, что она присутствует в клетке в большом числе копий, реплицируется относительно независимо от ядерного генома, наследуется только по материнской линии, характеризуется высокой скоростью мутаций и, соответственно, высоким уровнем популяционного полиморфизма. Синтез белков, кодируемых мтДНК, происходит в митохондриях с использованием кодируемых мтДНК транспортных и рибосомных РНК, однако все ферменты, участвующие в транскрипции, трансляции, репликации и в других процессах, обеспечивающих функционирование митохондриального генома и митохондрии в целом, кодируются ядром, синтезируются в цитоплазме и затем импортируются в митохондрии. Первоначально считалось, что высокая скорость мутаций (в том числе соматических) в мтДНК обусловлена «близостью» белковых комплексов дыхательной цепи, которая яв-

ляется основным источником свободных радикалов, в совокупности с отсутствием эффективных систем репарации ДНК, однако позже выяснилось, что в митохондриях присутствуют и функционируют почти все известные системы репарации ДНК [3].

Соответственно, наряду с «обычными» типами изменчивости, такими как однонуклеотидный и инсерционно-делеционный полиморфизм, важное значение имеет количество копий мтДНК в клетке, а также уровень гетероплазмии – доля молекул мтДНК, несущих какой-либо вариант (например, вызывающий заболевание), в общем пуле мтДНК. Оба показателя обладают внутриорганизменной вариабельностью в зависимости от клеток, органов и тканей, а также изменяются на протяжении жизни [4].

Полиморфизм мтДНК и популяционная генетика

Вскоре после определения последовательности мтДНК человека было показано, что население различных континентов характеризуется разными генотипами (митотипами), которые в то время определяли с помощью анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). В результате изучения такого полиморфизма в различных популяциях было выявлено значительное число митотипов, определяемых отдельными сайтами рестрикции, установлены «родственные» отношения между ними, и это позволило построить подробное родословное древо последовательностей мтДНК человека, указывающее на африканское происхождение вида *H. sapiens*. Отдельные ветви этого древа принято называть гаплогруппами. Распространение большинства гаплогрупп мтДНК географически дифференцировано и соотносится с путями расселения *Homo sapiens* по планете, а также с демографической историей популяций [5].

Исследования полиморфизма мтДНК внесли и продолжают вносить большой вклад в изучение популяционной истории человеческого вида. По мере развития технологий секвенирования методы генотипирования в этих исследованиях перешли от ПДРФ к секвенированию гипервариабельных участков D-петли, а затем и к секвенированию полной последовательности мтДНК. В последнее время большой вклад в прояснение истории человечества вносят работы по исследованию мтДНК древних людей, живших от 500 до 50 000 лет назад [6–7]. Следует отметить, что огромный массив данных, накопленный в результате популяционно-генетических исследований, находит свое практическое применение в области криминалистики [8].

Митохондриальный геном и наследственные заболевания

Мутации мтДНК с патогенным эффектом, в том числе точковые замены и протяженные делеции, вызывают развитие митохондриальных заболеваний, характеризующихся широким спектром симптомов, который зависит от уровня гетероплазмии патогенного варианта в тканях и органах пациента. Особой проблемой в этом случае является медико-генетическое консульти-

рование при планировании беременности для пациенток с митохондриальными синдромами, так как нельзя предсказать уровень гетероплазмы у ребенка, исходя из значения этого показателя у матери: в процессе образования и развития яйцеклеток популяция митохондрий проходит «бутылочное горлышко», и уровень гетероплазмы у детей может сильно варьировать вследствие генетического дрейфа. С другой стороны, современные репродуктивные технологии позволяют использовать «донорские митохондрии» для рождения ребенка без патогенного варианта мтДНК [9]. Кроме того, в последнее время развиваются методы редактирования генома митохондрий [10].

Полиморфизм мтДНК и многофакторные фенотипы

Полиморфизм мтДНК в популяциях – это не только «молчащие» нуклеотидные замены, но и замены аминокислот в белках. При этом некоторые аминокислотные замены в белках, кодируемых мтДНК, характеризуются довольно высокой популяционной частотой. Например, база данных результатов экзомного и геномного секвенирования GnomAD [11] содержит данные о 15 заменах аминокислот с частотой более 1% в гене *MT-ND5* (кодирует белок длиной 603 аминокислоты), и еще 48 миссенс-замен в этом гене зарегистрированы с частотой более 0,1%. В то же время в ядерном гене *NDUFS1*, кодирующем субъединицу того же комплекса I сопоставимой длины (741 аминокислота), известен только один аминокислотный полиморфизм с частотой 0,4%, остальные замены аминокислот имеют частоту менее 0,1%. Кроме того, каждый гаплотип мтДНК обычно имеет одновременно несколько аминокислотных замен по сравнению с референсной последовательностью. Современные исследования ассоциаций полиморфизма мтДНК с фенотипом ставят своей целью ответ на вопрос: как влияет популяционный полиморфизм на функцию митохондрий, и имеет ли место взаимодействие эффектов отдельных вариантов в одном гаплотипе – так называемый эпистаз – в современном, более широком понимании этого термина [12].

Функциональная значимость полиморфизма мтДНК показана на примере цибридов – это клетки, в которых ядро и митохондрии происходят от разных клеточных линий. Эксперименты по изучению клеточного дыхания в таких культурах клеток показали, что различные гаплогруппы мтДНК характеризуются разным уровнем потребления кислорода, продукции активных форм кислорода, продукции АТФ, а также могут различаться по реакции на различные стимулы [13–14]. Эти данные поднимают вопрос о роли естественного отбора в формировании картины полиморфизма мтДНК в популяциях. Иными словами, может ли полиморфизм мтДНК способствовать адаптации к условиям среды или влиять на предрасположенность к заболеваниям?

Адаптация к холоду и к пониженному содержанию кислорода в воздухе может быть связана с изменением метаболического состояния и функции митохондрий. Результаты некоторых исследований указывают на то, что гаплогруппы мтДНК, распространенные в северных регионах или в высокогорных популяциях, характеризуются определенными вариантами, которые могут способствовать адаптации к этим условиям, так как влияют на сопряженность/

разобшение электронтранспортной цепи [15–16]. Однако в таких исследованиях сложно отличить эффект отбора от эффекта дрейфа, так как популяции, долго существующие в экстремальных условиях, обычно немногочисленны. Таким образом, вопрос о роли полиморфизма мтДНК в адаптации человека к различным климатическим условиям пока остается открытым.

Ассоциативные исследования полиморфизма мтДНК как фактора, влияющего на предрасположенность к различным заболеваниям, а также на старение, довольно многочисленны, однако их результаты иногда противоречат друг другу. Причиной таких противоречий может быть дополнительный (эпистатический) эффект различных нуклеотидных замен в субгаплогруппах мтДНК, распространенных в разных популяциях. Работы последних лет показывают, что «генетический фон» нужно учитывать при оценке патогенности/доброкачественности генетического варианта в мтДНК. Самым известным примером являются мутации мтДНК, приводящие к развитию наследственной офтальмопатии Лебера: неблагоприятным фактором, усиливающим эффект этих мутаций, является принадлежность мтДНК к гаплогруппе J [17]. Эффект полиморфизма ядерных генов также может взаимодействовать с вариантами мтДНК. Кроме того, данные об индивидуальных полных последовательностях мтДНК позволяют анализировать вклад редких и так называемых «приватных» генетических вариантов в развитие заболеваний и отдельных фенотипов [18].

Вклад полиморфизма мтДНК в предрасположенность к заболеваниям рассматривают также в рамках эволюционной медицины. Сегодня для большинства людей доступна в избытке пища, богатая углеводами/калориями, и одновременно с этим снижается физическая активность людей. В то же время человеческий геном является эволюционно адаптированным к недостатку питания и к постоянным физическим нагрузкам. В связи с этим выдвинута гипотеза об «экономных» генотипах, которые имели селективное преимущество на протяжении всей истории вида *Homo sapiens*, но в современных условиях проявляют неблагоприятный эффект [19]. Кроме того, с развитием медицины растет продолжительность жизни, и вместе с ней заболеваемость болезнями, связанными со старением, а большую роль в процессе старения играет окислительный стресс, который непосредственно связан с функцией митохондрий. Поскольку митохондрии являются центральным звеном углеводного и энергетического обмена, а также непосредственно связаны с окислительным стрессом, данная гипотеза в полной мере может быть применена и для изучения полиморфизма мтДНК. В пользу этой гипотезы говорит тот факт, что наиболее частая у европейцев гаплогруппа H ассоциирована с некоторыми сердечно-сосудистыми заболеваниями и эндотипами в различных популяциях [20–26].

Заключение

Митохондриальная ДНК является небольшой, но важной и особенной частью генома. Исследования изменчивости мтДНК человека являются актуальными в различных аспектах – в частности, изучение её полиморфизма в популяциях имеет как теоретическое, так и прикладное значение.

Список источников

1. Панов А.В., Голубенко М.В., Даренская М.А., Колесников С.И. Происхождение митохондрий и их роль в эволюции жизни и здоровья человека // *Acta Biomedica Scientifica*. 2020. Т. 5, № 5. С. 12–25. doi: 10.29413/ABS.2020-5.5.2
2. Andrews R.M., Kubacka I., Chinnery P.F., Lightowlers R.N., Turnbull D.M., Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA // *Nat Genet*. 1999. Vol. 23, № 2. 147. doi: 10.1038/13779.
3. Wallace D.C., Chalkia D. Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013. Vol. 5, № 11. a021220. doi: 10.1101/cshperspect.a021220
4. Зиновкина Л.А. Механизмы репарации митохондриальной ДНК млекопитающих // *Биохимия*. 2018. Т. 83, № 2. С. 349–367. doi: 10.1134/S0006297918030045
5. Wallace D.C. Mitochondrial DNA variation in human radiation and disease // *Cell*. 2015. Vol. 163, № 1. PP. 33–38. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.067
6. Малайчук Б.А. Истоки митохондриального генофонда русских по результатам анализа современных и палеогеномных данных // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019. Т. 23, № 5. С. 588–593. doi: 10.18699/VJ19.529
7. Mylopotamitaki D., Weiss M., Fewlass H., Zavala E.I., Rougier H., Sümer A.P., Hajdinjak M., Smith G.M., Ruebens K., Sinet-Mathiot V., Pederzani S., Essel E., Harking F.S., Xia H., Hansen J., Kirchner A., Lauer T., Stahlschmidt M., Hein M., Talamo S., Wacker L., Meller H., Dietl H., Orschiedt J., Olsen J.V., Zeberg H., Prüfer K., Krause J., Meyer M., Welker F., McPherron S.P., Schüller T., Hublin J.J. Homo sapiens reached the higher latitudes of Europe by 45,000 years ago // *Nature*. 2024. Vol. 626, № 7998. PP. 341–346. doi: 10.1038/s41586-023-06923-7
8. Avila E., Graebín P., Chemale G., Freitas J., Kahmann A., Alho C.S. Full mtDNA genome sequencing of Brazilian admixed populations: A forensic-focused evaluation of a MPS application as an alternative to Sanger sequencing methods // *Forensic Sci Int Genet*. 2019. Vol. 42. PP. 154–164. doi: 10.1016/j.fsigen.2019.07.004
9. Farnezi H.C.M., Goulart A.C.X., Santos A.D., Ramos M.G., Penna M.L.F. Three-parent babies: Mitochondrial replacement therapies // *JBRA Assist Reprod*. 2020. Vol. 24, № 2. PP. 89–196. doi: h10.5935/1518-0557.20190086
10. Патрушев М.В., Каменский П.А., Мазунин И.О. Мутации митохондриальной ДНК и методы их коррекции // *Биохимия*. 2014. Т. 79, № 11. С. 1417–1428. doi: 10.1134/S0006297914110029
11. Chen S., Francioli L.C., Goodrich J.K., Collins R.L., Kanai M., Wang Q., Alföldi J., Watts N.A., Vittal C., Gauthier L.D., Poterba T., Wilson M.W., Tarasova Y., Phu W., Grant R., Yohannes M.T., Koenig Z., Farjoun Y., Banks E., Donnelly S., Gabriel S., Gupta N., Ferriera S., Tolonen C., Novod S., Bergelson L., Roazen D., Ruano-Rubio V., Covarrubias M., Llanwarne C., Petrillo N., Wade G., Jeandet T., Munshi R., Tibbetts K., Genome Aggregation Database (gnomAD) Consortium, O'Donnell-Luria A., Solomonson M., Seed C., Martin A.R., Talkowski M.E., Rehm H.L., Daly M.J., Tiao G., Neale B.M., MacArthur D.G., Karczewski K.J. A genomic mutational constraint map using variation in 76,156 human genomes // *Nature*. 2024. Vol. 625. PP. 92–100. doi: 10.1038/s41586-023-06045-0
12. Lehner B. Molecular mechanisms of epistasis within and between genes // *Trends Genet*. 2011. Vol. 27, № 8. PP. 323–331. doi: 10.1016/j.tig.2011.05.007
13. Lin T.K., Lin H.Y., Chen S.D., Chuang Y.C., Chuang J.H., Wang P.W., Huang S.T., Tiao M.M., Chen J.B., Liou C.W. The creation of cybrids harboring mitochondrial haplogroups in the Taiwanese population of ethnic Chinese background: an extensive in vitro tool for the study of mitochondrial genomic variations // *Oxid Med Cell Longev*. 2012. Vol. 2012. 824275. doi: 10.1155/2012/824275
14. Atilano S.R., Abedi S., Ianopol N.V., Singh M.K., Norman J.L., Malik D., Falatoonzadeh P., Chwa M., Nesburn A.B., Kuppermann B.D., Kenney M.C. Differential Epigenetic

- Status and Responses to Stressors between Retinal Cybrids Cells with African versus European Mitochondrial DNA: Insights into Disease Susceptibilities // *Cells*. 2022. Vol. 11, № 17. 2655. doi: 10.3390/cells11172655
15. Малирчук Б.А. Сигналы адаптивной эволюции митохондриальных генов у европейцев // *Биохимия*. 2011. Т. 76, № 6. С. 858–863. doi: 10.1134/S0006297911060113
 16. Li Q., Lin K., Sun H., Liu S., Huang K., Huang X., Chu J., Yang Z. Mitochondrial haplogroup M9a1a1c1b is associated with hypoxic adaptation in the Tibetans // *J. Hum Genet*. 2016. Vol. 61, № 12. PP. 1021–1026. doi: 10.1038/jhg.2016.95
 17. Wei W., Gomez-Duran A., Hudson G., Chinnery P.F. Background sequence characteristics influence the occurrence and severity of disease-causing mtDNA mutations // *PLoS Genet*. 2017. Vol. 13, № 12. e1007126. doi: 10.1371/journal.pgen.1007126
 18. Афанасьев С.А., Корепанов В.А., Бабушкина Н.П., Реброва Т.Ю., Муслимова Э.Ф., Голубенко М.В., Гарганеева А.А., Атабеков Т.А. Функциональная состоятельность митохондрий и полиморфизм митохондриального генома как факторы, влияющие на аритмогенез при хронической ишемической болезни сердца // *Вестник аритмологии*. 2024. Т. 31, № 1. С. 71–76. doi: 10.35336/VA-1294
 19. Пузырев В.П., Кучер А.Н. Эволюционно-онтогенетические аспекты патогенетики хронических болезней человека // *Генетика*. 2011. Т. 47, № 12. С. 1573–1585.
 20. Голубенко М.В., Салахов Р.Р., Макеева О.А., Гончарова И.А., Кашгалап В.В., Барбараш О.Л., Пузырев В.П. Ассоциации полиморфизма митохондриальной ДНК с инфарктом миокарда и прогностически значимыми признаками атеросклероза // *Молекулярная биология*. 2015. Т. 49, № 6. С. 968–976. doi: 10.7868/S0026898415050080
 21. Голубенко М.В., Шумакова Т.В., Макеева О.А., Тарасенко Н.В., Салахов Р.Р., Шипулин В.М., Назаренко М.С. Полиморфизм митохондриальной ДНК и ишемия миокарда: ассоциация гаплогруппы H // *Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины*. 2021. Т. 36, № 4. С. 70–77. doi: 10.29001/2073-8552-2021-36-4-70-77
 22. Fernández-Caggiano M., Barallobre-Barreiro J., Rego-Pérez I., Crespo-Leiro M.G., Paniagua M.J., Grillé Z., Blanco F.J., Doménech N. Mitochondrial haplogroups H and J: risk and protective factors for ischemic cardiomyopathy // *PLoS One*. 2012. Vol. 7, № 8. e44128. doi: 10.1371/journal.pone.0044128
 23. Fernández-Caggiano M., Barallobre-Barreiro J., Rego-Pérez I., Crespo-Leiro M.G., Paniagua M.J., Grillé Z., Blanco F.J., Doménech N. Mitochondrial DNA haplogroup H as a risk factor for idiopathic dilated cardiomyopathy in Spanish population // *Mitochondrion*. 2013. Vol. 13, № 4. PP. 263–268. doi: 10.1016/j.mito.2013.03.005
 24. Hagen C.M., Ait F.H., Hedley P.L., Jensen M.K., Havndrup O., Kanters J.K., Moolman-Smook J.C., Larsen S.O., Bundgaard H., Christiansen M. Mitochondrial haplogroups modify the risk of developing hypertrophic cardiomyopathy in a Danish population // *PLoS One*. 2013. Vol. 8, № 8. e71904. doi: 10.1371/journal.pone.0071904
 25. Kytövuori L., Junttila J., Huikuri H., Keinänen-Kiukaanniemi S., Majamaa K., Martikainen M.H. Mitochondrial DNA variation in sudden cardiac death: a population-based study // *Int J Legal Med*. 2020. Vol. 134, № 1. PP. 39–44. doi: 10.1007/s00414-019-02091-4
 26. Roselló-Díez E., Hove-Madsen L., Pérez-Grijalba V., Muñoz-Guijosa C., Artigas V., Maria Padró J., Domínguez-Garrido E. Mitochondrial genetic effect on atrial fibrillation: A case-control study // *Mitochondrion*. 2021. Vol. 56. PP. 15–24. doi: 10.1016/j.mito.2020.11.007

References

1. Panov AV, Golubenkov MV, Darenskaya MA, Kolesnikov SI. The Origin of Mitochondria and their Role in the Evolution of Life and Human Health. *Acta Biomedica Scientifica*. 2020;5(5):12-25. doi: 10.29413/ABS.2020-5.5.2 In Russian, English summary
2. Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet*. 1999;23(2):147. doi: 10.1038/13779
3. Zinovkina LA. Mechanisms of Mitochondrial DNA Repair in Mammals. *Biochemistry (Moscow)*. 2018;83(3):233-249. doi: 10.1134/S0006297918030045

4. Wallace DC, Chalkia D. Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(11):a021220. doi: 10.1101/cshperspect.a021220
5. Wallace DC. Mitochondrial DNA variation in human radiation and disease. *Cell.* 2015;163(1):33-38. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.067
6. Malyarchuk BA. Sources of the mitochondrial gene pool of Russians by the results of analysis of modern and paleogenomic data. *Vavilovskij žurnal genetiki i selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2019; 23(5):588-593. doi: 10.18699/VJ19.529
7. Mylopotamitaki D, Weiss M, Fewlass H, Zavala EI, Rougier H, Sümer AP, Hajdinjak M, Smith GM, Ruebens K, Sinet-Mathiot V, Pederzani S, Essel E, Harking FS, Xia H, Hansen J, Kirchner A, Lauer T, Stahlschmidt M, Hein M, Talamo S, Wacker L, Meller H, Dietl H, Orschiedt J, Olsen JV, Zeberg H, Prüfer K, Krause J, Meyer M, Welker F, McPherron SP, Schüller T, Hublin JJ. Homo sapiens reached the higher latitudes of Europe by 45,000 years ago. *Nature.* 2024;626(7998):341-346. doi: 10.1038/s41586-023-06923-7
8. Avila E, Graebin P, Chemale G, Freitas J, Kahmann A, Alho CS. Full mtDNA genome sequencing of Brazilian admixed populations: A forensic-focused evaluation of a MPS application as an alternative to Sanger sequencing methods. *Forensic Sci Int Genet.* 2019;42:154-164. doi: 10.1016/j.fsigen.2019.07.004
9. Farnezi HCM, Goulart ACX, Santos AD, Ramos MG, Penna MLF. Three-parent babies: Mitochondrial replacement therapies. *JBRA Assist Reprod.* 2020 May 1;24(2):189-196. doi: 10.5935/1518-0557.20190086
10. Patrushev MV, Kamenski PA, Mazunin IO. Mutations in mitochondrial DNA and approaches for their correction. *Biochemistry (Mosc).* 2014;79(11):1151-1160. doi: 10.1134/S0006297914110029
11. Chen S, Francioli LC, Goodrich JK, Collins RL, Kanai M, Wang Q, Alföldi J, Watts NA, Vittal C, Gauthier LD, Poterba T, Wilson MW, Tarasova Y, Phu W, Grant R, Yohannes MT, Koenig Z, Farjoun Y, Banks E, Donnelly S, Gabriel S, Gupta N, Ferreira S, Tolonen C, Novod S, Bergelson L, Roazen D, Ruano-Rubio V, Covarrubias M, Llanwarne C, Petrillo N, Wade G, Jeandet T, Munshi R, Tibbetts K, Genome Aggregation Database (gnomAD) Consortium, O'Donnell-Luria A, Solomonson M, Seed C, Martin AR, Talkowski ME, Rehm HL, Daly MJ, Tiao G, Neale BM, MacArthur DG, Karczewski, KJ A genomic mutational constraint map using variation in 76,156 human genomes *Nature.* 2024;625:92-100. doi: 10.1038/s41586-023-06045-0
12. Lehner B. Molecular mechanisms of epistasis within and between genes. *Trends Genet.* 2011;27(8):323-331. doi: 10.1016/j.tig.2011.05.007
13. Lin TK, Lin HY, Chen SD, Chuang YC, Chuang JH, Wang PW, Huang ST, Tiao MM, Chen JB, Liou CW. The creation of cybrids harboring mitochondrial haplogroups in the Taiwanese population of ethnic Chinese background: an extensive in vitro tool for the study of mitochondrial genomic variations. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012:824275. doi: 10.1155/2012/824275
14. Atilano SR, Abedi S, Ianopol NV, Singh MK, Norman JL, Malik D, Falatoonzadeh P, Chwa M, Nesburn AB, Kuppermann BD, Kenney MC. Differential Epigenetic Status and Responses to Stressors between Retinal Cybrids Cells with African versus European Mitochondrial DNA: Insights into Disease Susceptibilities. *Cells.* 2022;11(17):2655. doi: 10.3390/cells11172655
15. Malyarchuk BA. Adaptive evolution signals in mitochondrial genes of Europeans. *Biochemistry (Mosc).* 2011;76(6):702-706. doi: 10.1134/S0006297911060113
16. Li Q, Lin K, Sun H, Liu S, Huang K, Huang X, Chu J, Yang Z. Mitochondrial haplogroup M9a1a1c1b is associated with hypoxic adaptation in the Tibetans. *J Hum Genet.* 2016;61(12):1021-1026. doi: 10.1038/jhg.2016.95
17. Wei W, Gomez-Duran A, Hudson G, Chinnery PF. Background sequence characteristics influence the occurrence and severity of disease-causing mtDNA mutations. *PLoS Genet.* 2017;13(12):e1007126. doi: 10.1371/journal.pgen.1007126
18. Afanasiev SA, Korepanov VA, Babushkina NP, Rebrova TYu, Muslimova EF, Golubenko MV, Garganeeva AA, Atabekov TA. Functional ability of mitochondria and mitochondrial

- genome polymorphism as factors affecting arrhythmogenesis in chronic coronary artery disease. *Journal of Arrhythmology*. 2024;31(1):71-76. doi: 10.35336/VA-1294
19. Puzyrev VP, Kucher AN. Evolutionary ontogenetic aspects of pathogenetics of chronic human diseases. *Genetika = Russian Journal of Genetics*. 2011;47(12):1395-1405. doi: 10.1134/S102279541112012X
 20. Golubenko MV, Puzyrev VP, Salakhov RR, Makeeva OA, Goncharova IA, Kashtalap VV, Barbarash OL. Association of mitochondrial DNA polymorphism with myocardial infarction and prognostic signs for atherosclerosis. *Molekuliarnaiia Biologiia = Molecular Biology (Mosk)*. 2015;49(6):867-874. doi: 10.1134/S0026893315050088
 21. Golubenko MV, Shumakova TV, Makeeva OA, Tarasenko NV, Salakhov RR, Shipulin VM, Nazarenko MS. Mitochondrial DNA polymorphism and myocardial ischemia: Association of haplogroup H with heart failure. *The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2021;36(4):70-77. doi: 10.29001/2073-8552-2021-36-4-70-77
 22. Fernández-Caggiano M, Barallobre-Barreiro J, Rego-Pérez I, Crespo-Leiro MG, Paniagua MJ, Grillé Z, Blanco FJ, Doménech N. Mitochondrial haplogroups H and J: risk and protective factors for ischemic cardiomyopathy. *PLoS One*. 2012;7(8):e44128. doi: 10.1371/journal.pone.0044128
 23. Fernández-Caggiano M, Barallobre-Barreiro J, Rego-Pérez I, Crespo-Leiro MG, Paniagua MJ, Grillé Z, Blanco FJ, Doménech N. Mitochondrial DNA haplogroup H as a risk factor for idiopathic dilated cardiomyopathy in Spanish population. *Mitochondrion*. 2013 Jul;13(4):263-8. doi: 10.1016/j.mito.2013.03.005
 24. Hagen CM, Aidt FH, Hedley PL, Jensen MK, Havndrup O, Kanters JK, Moolman-Smook JC, Larsen SO, Bundgaard H, Christiansen M. Mitochondrial haplogroups modify the risk of developing hypertrophic cardiomyopathy in a Danish population. *PLoS One*. 2013;8(8):e71904. doi: 10.1371/journal.pone.0071904
 25. Kytövuori L, Junttila J, Huikuri H, Keinänen-Kiukaanniemi S, Majamaa K, Martikainen MH. Mitochondrial DNA variation in sudden cardiac death: a population-based study. *Int J Legal Med*. 2020;134(1):39-44. doi: 10.1007/s00414-019-02091-4
 26. Roselló-Díez E, Hove-Madsen L, Pérez-Grijalba V, Muñoz-Guijosa C, Artigas V, Maria Padró J, Domínguez-Garrido E. Mitochondrial genetic effect on atrial fibrillation: A case-control study. *Mitochondrion*. 2021;56:15-24. doi: 10.1016/j.mito.2020.11.007

Информация об авторе:

Голубенко Мария Владимировна, канд. биол. наук, с.н.с. лаборатории популяционной генетики научно-исследовательского института медицинской генетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (Томск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7692-9954>

E-mail: maria.golubenko@medgenetics.ru

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Information about the author:

Maria V. Golubenko, Cand. Sci. (Biol.), Senior researcher, Population genetics laboratory, Research Institute of Medical Genetics, Federal State Budgetary Scientific Institution "Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences" (Tomsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7692-9954>

E-mail: maria.golubenko@medgenetics.ru

The Author declares no conflict of interest.

Статья поступила в редакцию 05.08.2024;
одобрена после рецензирования 22.10.2024; принята к публикации 03.03.2025.

The article was submitted 05.08.2024;
approved after reviewing 22.10.2024; accepted for publication 03.03.2025.

Научная статья
УДК 633.11:585
doi: 10.17223/19988591/69/8

Глобальное потепление и генетика типа и скорости развития пшениц

Николай Петрович Гончаров¹, Кирилл Олегович Плотников²,
Григорий Юрьевич Чепурнов³, Илья Александрович Каменев⁴,
Борис Федорович Немцев⁵, Светлана Эдуардовна Смоленская⁶,
Александр Геннадьевич Блинов⁷

^{1, 2, 3, 6, 7} Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁴ Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

⁵ Сибирский научно-исследовательский институт растениеводства и селекции –
филиал ФИЦ «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук», Краснообск, Новосибирский регион, Россия

¹ gonch@bionet.nsc.ru

² ko.plotnikov@bionet.nsc.ru

³ grigory.tchepurnov@yandex.ru

⁴ ilya.kamenev.1441@bk.ru

⁵ nembor@yandex.ru

⁶ morpha@bionet.nsc.ru

⁷ blinov@bionet.nsc.ru

Аннотация. Повышение температуры в течение вегетационного периода может привести к снижению урожайности сельскохозяйственных культур, что будет иметь последствия для растениеводства и продовольственной безопасности. Основным фактором, ограничивающим выращивание пшеницы и формирование высококачественного зерна, является продолжительность безморозного периода. Селекция в сложных климатических условиях Сибири должна быть направлена на создание относительно скороспелых, высокоурожайных, пластичных сортов. Варьирование продолжительности сроков колошения и созревания является важным элементом адаптации пшеницы к конкретным условиям выращивания. Цель работы – оценка коллекции сортов яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) по продолжительности вегетационного периода и определение у них аллелей гена *Vrn-A1*. В данном исследовании использовали восемь сортов мягкой яровой пшеницы и две изогенные линии с известными аллелями гена *Vrn-A1* (контроль). Образцы выращивали в гидропонной теплице. Установлено, что пять образцов из восьми имели инсерцию мобильного генетического элемента в промоторе гена *Vrn-A1* длиной 965 п.н. – аллель *Vrn-1a*, а три образца – делецию в промоторной области. При электрофорезе продуктов ПЦР образцы с делецией показали наличие фрагмента длиной 714 п.н. – аллель *Vrn-1b*. При изучении полиморфизма гена *Vrn-A1* выявлено преобладание аллеля *Vrn-A1a*, появление которого обусловлено наличием инсерции мобильного генетического элемента не только у сортов новосибирской селекции, но и у сортов других регионов. Корреляционный анализ, примененный для установления зависимости времени колошения от конкретного аллеля гена *Vrn-1*, показал значение $r = 0,57$. Это позволяет сделать вывод об умеренной корреляции влияния аллелей гена *Vrn-A1* на продолжительность периода всходы–колошение.

Ключевые слова: *Triticum*, фенология, скороспелость, селекция, Западная Сибирь, ген *Vrn-A1*

Источник финансирования: исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-16-20026) и правительства Новосибирской области.

Благодарность: растения выращены в ЦПК репродукции растений ИЦиГ СО РАН в рамках бюджетного проекта FWNR-2022-0017.

Для цитирования: Гончаров Н.П., Плотников К.О., Чепурнов Г.Ю., Каменев И.А., Немцев Б.Ф., Смоленская С.Э., Блинов А.Г. Глобальное потепление и генетика типа и скорости развития пшениц // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2025. № 69. С. 68–75. doi: 10.17223/19988591/69/8

Original article

doi: 10.17223/19988591/69/8

Global warming and the genetics of wheat type and rate of development

**Nikolay P. Goncharov¹, Kirill O. Plotnikov², Grigory Y. Chepurnov³,
Ilya A. Kamenev⁴, Boris F. Nemtsev⁵, Svetlana E. Smolenskaya⁶,
Alexander G. Blinov⁷**

^{1, 2, 3, 6, 7} *Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

⁴ *Novosibirsk State Agricultural University, Novosibirsk, Russia*

⁵ *Siberian Research Institute of Plant Growing and Breeding - branch of Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoobsk, Novosibirsk region, Russia*

¹ *gonch@bionet.nsc.ru*

² *ko.plotnikov@bionet.nsc.ru*

³ *grigory.tchepurnov@yandex.ru*

⁴ *ilya.kamenev.1441@bk.ru*

⁵ *nembor@yandex.ru*

⁶ *morpha@bionet.nsc.ru*

⁷ *blinov@bionet.nsc.ru*

Summary. Agricultural production in the XXI century has faced significant environmental challenges, the most important of which is global and local climate change. To solve the problems it is necessary to produce new varieties of crops, and first of all, common wheat (*Triticum aestivum* L.). Variation in the duration of ripening period is an important element of wheat adaptability to specific cultivation conditions. The question of whether a variety that is early in earing date remains early in maturity date is essential, but data on this problem are rather limited. Thus, to produce new early maturing forms of spring common wheat, it is worth paying attention to the sources of alleles used in the southern regions of Russia or abroad. The aim of our investigation was to evaluate a collection of common spring wheat accessions for the duration of the growing season and allelic composition of the *Vrn-A1* (response to vernalization) gene. In this study, 8 cultivars of spring common wheat and 2 control near-isogenic lines were used (See Table 1). The studied accessions were grown in hydroponic greenhouse. To extract genomic DNA from the collected samples, 30–80 mg of leaves frozen in liquid nitrogen were used. DNA extraction was performed using a commercial kit “Wizard® Genomic DNA Purification Kit” (Promega, USA) according to the manufacturer's protocol. The *Vrn-A1* locus polymorphism study was performed using a set of previously described allele-specific primers. Confirmation of the presence of a deletion into the

Vrn-1 gene promoter or insertion of a mobile genetic element was performed using Sanger sequencing. As a result of these studies, it was found that five cultivars had an insertion of a mobile genetic element in the promoter of the *Vrn-1* gene and were characterized by the presence of a fragment of 965 bp in length on electrophoresis, while three cultivars showed a deletion in the promoter sequence. When PCR products were electrophoresed, cultivars with deletion showed a fragment of 714 bp in length (See Fig. 1). The results were also confirmed by Sanger sequencing. Correlation analysis applied to establish the dependence of earing time on the allele of the *Vrn-1* gene showed a value of $r = 0.57$, which allows us to conclude that the allele of the *Vrn-1* gene is moderately correlated with the duration of shooting to heading period. The duration of the growing period, and, consequently, early maturity, is related to the transition from vegetative to generative development. In wheat, the complex process of transition from vegetative to generative development is largely determined by allelic diversity of *Vrn* genes regulating the type of growth (spring vs. winter). In the course of investigation on the study of *Vrn-1* gene polymorphism, the prevalence of the *Vrn-1* allele, the occurrence of which is due to the presence of an insertion of a mobile genetic element, was found not only in varieties of Novosibirsk breeding, but also in commercial cultivars from other regions.

The article contains 1 Figure, 1 Table, 5 References.

Keywords: *Triticum*, phenology, earliness, breeding, West Siberia, *Vrn-1* gene

Fundings: This work was supported by Russian Science Foundation (Grant No 22-16-20026) and the Government of Novosibirsk region.

Acknowledgments: The plants were grown at the Center for Common Use for Plant Reproduction of ICG SB RAS within the budgetary project FWN-2022-0017.

For citation: Goncharov NP, Plotnikov KO, Chepurinov GY, Kamenev IA, Nemtsev BF, Smolenskaya SE, Blinov AG. Global warming and the genetics of wheat type and rate of development. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2025;69:68-75. doi: 10.17223/19988591/69/8

Введение

Сельскохозяйственное производство в XXI в. столкнулось с существенными экологическими вызовами, наиболее важным из которых является глобальное и локальное изменение климата. За последнее столетие (1920–2020 гг.) произошло увеличение среднегодовой температуры воздуха на 2,17°C, среднегодовая норма осадков возросла на 85,5 мм в год [1].

Для решения глобальных проблем необходимо создание новых сортов с/х культур, и в первую очередь яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). Главным фактором, лимитирующим ее возделывание и формирование высококачественного зерна, является продолжительность безморозного периода. Сложные климатические условия Сибири свидетельствуют о том, что селекция должна быть направлена на создание скороспелых, высокоурожайных и пластичных сортов.

Признаки продолжительности периода всходы–колошение и всходы–созревание являются важными для приспособляемости пшеницы к конкретным условиям возделывания. Вопрос о том, остается ли сорт, раннеспелый

по дате колошения, раннеспелым по дате созревания, является существенным, но данные по этой проблеме довольно ограничены [2]. На данный момент аллельный состав генов *Vrn* (response to vernalization) и *Ppd* (response to photoperiod) возделываемых в Новосибирской области сортов яровой мягкой пшеницы известен и не отличается большим разнообразием [3]. Таким образом, для создания новых скороспелых форм этой основной зерновой для РФ культуры стоит обратить внимание на источники аллелей, используемые в южных регионах России и/или за рубежом. Цель работы – оценка коллекции образцов яровой мягкой пшеницы по продолжительности вегетационного периода и аллельному составу гена *Vrn-A1*, контролирующего у них яровой тип развития и скорость развития (скороспелость).

Материалы и методы

В исследовании использовалось 8 сортов яровой мягкой пшеницы новосибирской и краснодарской селекции и 2 изогенные линии австралийского сорта Triple Dirk с известными аллелями гена *Vrn-A1* (контроль). Образцы выращивались в гидропонной теплице Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск) осенью 2023 г. Для каждого растения, выращиваемого в теплице, определялся период от всходов до колошения (в днях).

Геномную ДНК выделяли из собранных образцов листьев (30–80 мг), замороженных в жидком азоте. Экстракцию ДНК проводили коммерческим набором «Wizard® Genomic DNA Purification Kit» (Promega, США) в соответствии с протоколом производителя. Исследование аллелей *Vrn-A1* проводили с использованием ранее описанных аллель-специфичных праймеров [4]. Визуализация результатов ПЦР выполнена с помощью электрофоретического разделения продуктов реакции в 1%-ном агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Наличие в промоторе гена *Vrn-A1* делеции или вставки мобильного генетического элемента определяли с помощью секвенирования по Сэнгеру. Для статистической обработки результатов рассчитывался коэффициент корреляции Пирсона (*r*-Пирсона) [5]. Его расчет проводили при помощи программного языка R 4.2.2 с использованием стандартных статпакетов.

Результаты исследования и обсуждение

В результате проведенных исследований было обнаружено, что пять сортов из восьми имели вставку мобильного генетического элемента (таблица) в промоторе гена *Vrn-A1* и характеризовались наличием на электрофореze фрагмента длиной 965 п.о. (соответствующей аллелю *Vrn-A1a*), тогда как у трех образцов была обнаружена делеция в промоторе (рис. 1). При проведении электрофореze продуктов ПЦР образцы с делецией демонстрировали фрагмент длиной 714 п.о., соответствующей аллелю *Vrn-A1b* (рис. 1). Полученные результаты подтверждены секвенированием по Сэнгеру.

Корреляционный анализ, примененный для установления связи времени колошения с наличием конкретного аллеля гена *Vrn-A1*, показал значение

$r = 0,57$, что позволяет сделать вывод об их умеренной связи с продолжительностью периода всходы–колошение.

Результаты изучения аллельного состава гена *Vrn-A1* и продолжительности вегетационного периода образцов яровой мягкой пшеницы в 2023 г.

[Results of *Vrn-A1* gene allele polymorphism and heading time of spring soft wheat samples in 2023]

№	Название сорта (линии) [Name of variety or line]	Аллель гена <i>Vrn-A1</i> [<i>Vrn-A1</i> gene allele]	Период всходы–колошение [Days to Heading]	Происхождение [Origin]
1	Triple Dirk A	A1a	40 ± 1,2	Австралия [Australia]
2	Triple Dirk D	A1a	38 ± 1,1	Австралия [Australia]
3	Курьер [Kuryer]	A1a	40 ± 3,1	Краснодарский край [Krasnodar region]
4	Мадам [Madam]	A1b	39 ± 1,6	Краснодарский край [Krasnodar region]
5	Данко [Danko]	A1b	41 ± 1,3	Краснодарский край [Krasnodar region]
6	Кетрин [Ketrin]	A1a	41 ± 1,8	Новая Зеландия [New Zealand]
7	Тая [Taya]	A1a	41 ± 1,9	Краснодарский край [Krasnodar region]
8	Новосибирская 41 [Novosibirskaya 41]	A1a	39 ± 1,3	Новосибирская область [Novosibirsk region]
9	Новосибирская 31 [Novosibirskaya 31]	A1b	40 ± 1,4	Новосибирская область [Novosibirsk region]
10	Новосибирская 18 [Novosibirskaya 18]	A1a	35 ± 1,6	Новосибирская область [Novosibirsk region]

Примечание. Данные по колошению представлены в виде средних арифметических ± стандартная ошибка средней.

[*Note.* Heading data are presented as arithmetic means ± standard error of the mean].

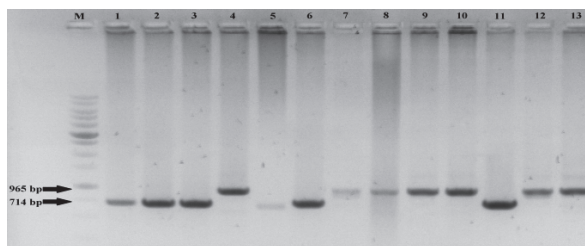


Рис. 1. Результаты электрофореза продуктов ПЦР, полученных с использованием аллель-специфичных праймеров для промотора гена *Vrn-A1* [4]: М – маркер молекулярных масс, 1–3 – образцы твердой пшеницы (*T. durum* Desf.) с аллелями *Vrn-A1b* (контроль), 4 – Курьер, 5 – Мадам, 6 – Данко, 7 – Кетрин, 8 – Тая, 9 – Новосибирская 41, 10 – Triple Dirk A, 11 – Новосибирская 31, 12 – Новосибирская 18, 13 – Triple Dirk D

[Fig. 1. Results of electrophoresis of PCR products obtained from primers for the *Vrn-A1* gene promoter [4]: M - marker of molecular weights, 1-3 – *T. durum* Desf. accessions with the *Vrn-A1b* allele (controls), 4 - Kuryer, 5 - Madam, 6 - Danko, 7 - Ketrin, 8 - Taya, 9 - Novosibirskaya 41, 10 - Triple Dirk A, 11 - Novosibirskaya 31, 12 - Novosibirskaya 18, 13 - Triple Dirk D]

Ранее уже было показано преобладание доминантных аллелей гена *Vrn-A1* в сортах сибирской селекции [3]. В данной работе показываем, что у всех изученных нами сортов, в том числе возделываемых в более южных широтах, присутствуют доминантные аллели этого гена. Умеренная связь продолжительности вегетационного периода с различными аллельными вариантами гена *Vrn-A1*, содержащими мутации в промоторе, говорит о возможном влиянии этой области генома на выраженность признака скороспелость/позднеспелость. Понимание генетических механизмов регуляции времени колошения растений яровой мягкой пшеницы будет способствовать созданию высокоадаптивных сортов нового поколения этой культуры с оптимальной выраженностью данного признака для конкретных зон возделывания, отражающей локальные особенности климатических условий. Ввиду локальных и глобальных изменений климата во всех зонах возделывания пшеницы (участвовавшие в последнее время летние засухи и ранняя весна с возвратными заморозками) изучение аллельного состава генов *Vrn*, контролирующих формирование оптимальной продолжительности вегетационного периода, имеет важное значение для селекции.

Заключение

Изучение полиморфизма гена *Vrn-A1* показало преобладание доминантного аллеля *Vrn-A1a*, возникновение которого обусловлено наличием вставки мобильного генетического элемента не только у сортов новосибирской селекции, но и у сортов других регионов, например краснодарской селекции.

Список источников

1. Ефимов В.М., Речкин Д.В., Гончаров Н.П. Многомерный анализ многолетних климатических данных в связи с урожайностью, скороспелостью и проблемой глобального потепления // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2024. Т. 28, № 2. С. 155–165. doi: 10.18699/vjgb-24-18
2. Tsenov N. Relation between time to heading and date of maturity of winter common wheat varieties (*Triticum aestivum* L.) // Agricultural Science and Technology. 2009. Vol. 4. PP. 126–132.
3. Смоленская С.Э., Ефимов В.М., Кручинина Ю.В., Немцев Б.Ф., Чепурнов Г.Ю., Овчинникова Е.С., Белан И.А., Зуев Е.В., Чжоу Ч., Пискарев В.В., Гончаров Н.П. Скороспелость и морфотип сортов мягкой пшеницы Западной и Восточной Сибири // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2022. Т. 26, № 7. С. 662–674. doi: 10.18699/VJGB-22-81
4. Yan L., Helguera M., Kato K., Fukuyama S., Sherman J., Dubcovsky J. Allelic variation at the *VRN-1* promoter region in polyploid wheat // Theor. Appl. Genet. 2004. Vol. 109. PP. 1677–1686. doi: 10.1007/s00122-004-1796-4
5. Pearson K. Notes on regression and inheritance in the case of two parents // Proceedings of the Royal Society of London. 1895. Vol. 58. PP. 240–242. doi: 10.1098/rspl.1895.0041

References

1. Efimov VM, Rechkin DV, Goncharov NP. Multivariate analysis of long-term climate data in connection with yield, earliness and the problem of global warming. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii*. 2024;28(2):155-165. doi: 10.18699/vjgb-24-18

2. Tsenov N. Relation between time to heading and date of maturity of winter common wheat varieties (*Triticum aestivum* L.). *Agricultural Science and Technology*. 2009;4:126-132.
3. Smolenskaya SE, Efimov VM, Kruchinina YV, Nemtsev BF, Chepurnov GY, Ovchinnikova ES, Belan IA, Zuev EV, Chenxi Z, Piskarev VV, Goncharov NP. Earliness and morphotypes of common wheat cultivars of Western and Eastern Siberia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii*. 2022;26(7):662-674. doi: 10.18699/VJGB-22-81
4. Yan L, Helguera M, Kato K, Fukuyama S, Sherman J, Dubcovsky J. Allelic variation at the *VRN-1* promoter region in polyploid wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2004;109:1677-1686. doi: 10.1007/s00122-004-1796-4
5. Pearson K. Notes on regression and inheritance in the case of two parents. *Proceedings of the Royal Society of London*. 1895;58:240-242. doi: 10.1098/rspl.1895.0041

Информация об авторах:

Гончаров Николай Петрович, д-р биол. наук, академик РАН, г.н.с. сектора генетики пшениц ФИЦ «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (Новосибирск, Россия).

E-mail: gonch@bionet.nsc.ru

Плотников Кирилл Олегович, инженер ФИЦ «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (Новосибирск, Россия).

E-mail: ko.plotnikov@bionet.nsc.ru

Григорий Юрьевич Чепурнов, м.н.с. ФИЦ «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (Новосибирск, Россия).

E-mail: grigory.tchepurnov@yandex.ru

Каменев Илья Александрович, аспирант ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный аграрный университет» (Новосибирск, Россия).

E-mail: ilya.kamenev.1441@bk.ru

Немцев Борис Федорович, агроном СибНИИРС – филиала Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (Краснообск, НСО, Россия).

E-mail: nembor@yandex.ru

Смоленская Светлана Эдуардовна, н.с. ФИЦ «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (Новосибирск, Россия).

E-mail: morpha@bionet.nsc.ru

Блинов Александр Геннадьевич, канд. биол. наук, в.н.с. ФИЦ «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (Новосибирск, Россия).

E-mail: blinov@bionet.nsc.ru

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Information about the authors:

Nikolay P. Goncharov, Doctor of Sciences (Biology), Full member of the Russian Academy of Sciences, Principal Researcher of Wheat Genetics laboratory, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian (Novosibirsk, Russian Federation).

E-mail: gonch@bionet.nsc.ru

Kirill O. Plotnikov, engineer, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian (Novosibirsk, Russian Federation).

E-mail: ko.plotnikov@bionet.nsc.ru

Grigory Y. Chepurnov, junior researcher, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian (Novosibirsk, Russian Federation).

E-mail: grigory.tchepurnov@yandex.ru

Ilya A. Kamenev, postgraduate student, Novosibirsk State Agricultural University (Novosibirsk, Russian Federation).

E-mail: ilya.kamenev.1441@bk.ru

Boris F. Nemtsev, agronomist, SibNIIRS – filial Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian (Krasnoobsk, Novosibirsk region, Russian Federation).

E-mail: nembor@yandex.ru

Svetlana E. Smolenskaya, researcher, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian (Novosibirsk, Russian Federation).

E-mail: morpha@bionet.nsc.ru

Alexander G. Blinov, PhD in Biology, leading researcher, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian (Novosibirsk, Russian Federation).

E-mail: blinov@bionet.nsc.ru

The Authors declare no conflict of interest.

*Статья поступила в редакцию 31.07.2024;
одобрена после рецензирования 27.11.2024; принята к публикации 03.03.2025.*

*The article was submitted 31.07.2024;
approved after reviewing 27.11.2024; accepted for publication 03.03.2025.*

Научная статья

УДК 618.19-006.6-036.17:577.2

doi: 10.17223/19988591/69/9

Роль TGF- β 1/PI3K/Akt опосредованного сигнального пути в прогрессировании эстроген-позитивного рака молочной железы

**Татьяна Анатольевна Дронова¹, Наталия Николаевна Бабышкина²,
Сергей Владимирович Вторушин³, Надежда Викторовна Чердынцева⁴**

^{1, 2, 3, 4} Томский национальный исследовательский медицинский центр

Российской академии наук, Томск, Россия

² Сибирский государственный медицинский университет

Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск, Россия

¹ <https://orcid.org/0000-0003-3009-2404>, tanyadronova@mail.ru

² <https://orcid.org/0000-0002-0562-3878>, nbabyshkina@mail.ru

³ <https://orcid.org/0000-0002-1195-4008>, wtorushin@rambler.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0003-1526-901>, nvch@tnimc.ru

Аннотация. Изучение факторов, способствующих формированию резистентности к адъювантной гормонотерапии при эстроген-позитивном раке молочной железы (РМЖ) является важным аспектом научных исследований. В данной работе с использованием метода проточной цитофлуориметрии изучено содержание белковых продуктов ключевых генов TGF- β 1 и PI3K/Akt – сигнальных каскадов. Работа проведена среди 65 пациенток с первично верифицированным диагнозом эстроген-позитивный РМЖ (T1-4N0-3M0). Показано, что наличие клеток, экспрессирующих TGF- β R1 и TGF- β R2, а также высокое содержание клеточных популяций pAkt1-/TGF- β R2+ и циклин D1+/TGF β R2+, ассоциировано с благоприятным прогнозом заболевания. Пациентки, в опухолевой ткани которых отмечено высокое содержание белка pAkt1, pAkt1+/TGF- β R2+ и циклин D1+/TGF β R2- клеток, не отвечали на терапию тамоксифеном в адъювантном режиме. Полученные результаты открывают перспективу поиска новых молекулярно-генетических маркеров, вовлеченных в механизмы развития резистентного к гормонотерапии фенотипа опухоли.

Ключевые слова: эстроген-позитивный рак молочной железы, трансформирующий фактор роста- β 1 (TGF- β 1), PI3K/Akt – сигнальный каскад, тамоксифен, резистентность, проточная цитофлуориметрия

Для цитирования: Дронова Т.А., Бабышкина Н.Н., Вторушин С.В., Чердынцева Н.В. Роль TGF- β 1/PI3K/Akt опосредованного сигнального пути в прогрессировании эстроген-позитивного рака молочной железы // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2025. № 69. С. 76–82. doi: 10.17223/19988591/69/9

The role of the TGF- β 1/PI3K/Akt mediated signaling pathway in the progression of estrogen-positive breast cancer

**Tatyana A. Dronova¹, Nataliya N. Babyshkina², Sergey V. Vtorushin³,
Nadezhda V. Cherdyntseva⁴**

^{1, 2, 3, 4} *Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center,
Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation*

² *Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation*

¹ <https://orcid.org/0000-0003-3009-2404>, tanyadronova@mail.ru

² <https://orcid.org/0000-0002-0562-3878>, nbabyshkina@mail.ru

³ <https://orcid.org/0000-0002-1195-4008>, wtorushin@rambler.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0003-1526-901>, nvch@tnimc.ru

Summary. The study of factors contributing to the adjuvant hormone therapy resistance in estrogen-positive breast cancer (BC) is an important aspect of scientific research. Tamoxifen resistance can be determined by the regulation of the estrogen receptor signaling pathway via membrane tyrosine kinases. Among the various membrane kinases, the activation of the transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) and the triggering of alternative PI3K/Akt signaling can be critical in the hormonal resistance. The aim of the study was to analyze the protein expression of TGF- β 1, TGF- β R1, TGF- β R2, pAkt1, cyclin D1 as well as the cell populations of TGF- β 1/TGF- β R2, TGF- β R1/TGF- β R2, pAkt1/TGF- β R2 and cyclin D1/TGF- β R2 in tumor tissue depending on the response to tamoxifen treatment. This study included 65 BC patients (T₁₋₄N₀₋₃M₀) who received breast-conserving surgery or radical mastectomy, radiation and/or chemotherapy (if indications) and adjuvant hormonal therapy with tamoxifen (5 years, 20 mg/day). Patients without any recurrence or metastasis the adjuvant tamoxifen therapy were classified as a tamoxifen-sensitive subgroup ((TS), $N = 55$ (84.6%)); patients with distant metastasis or recurrence were classified as resistant to tamoxifen ((TR), $N = 10$ (15.4%)). Proteins expression as well as cell population expression was assessed using a CytoFLEX flow cytometer (Beckman Coulter, USA). Progression-free survival (PFS) was estimated according to the Kaplan–Meier method, and survival differences between groups were determined using the log-rank test. P-value of less than 0.05 was considered statistically significant. Tumors with high of TGF- β R1 and TGF- β R2 protein expression were more prevalent among TS patients ($p = 0.036$ and $p = 0.006$; respectively. See Fig. 1). Increased risk of breast cancer progression was associated with a high pAkt1 expression in tumor cells ($p = 0.024$, See Fig. 1). Patients with the high pAkt1+/TGF- β R2+ and cyclin D1+/TGF β R2- expression in tumor tissue were less sensitive to tamoxifen treatment ($p = 0.006$ and $p = 0.000$; respectively). However, a high percentage of pAkt1-/TGF- β R2+ and cyclin D1+/TGF β R2+ cells was detected in the tumor tissue of patients with the response to treatment ($p = 0.001$ and $p = 0.003$, respectively). High TGF- β R2 and pAkt1-/TGF- β R2+ expression was associated with longer progression-free survival (*log-rank* $p = 0.006$ and *log-rank* $p = 0.008$). Moreover, we demonstrated a significant relationship of both high pAkt1 and pAkt1+/TGF- β R2+, pAkt1+/TGF- β R2- expression with poor survival of breast cancer patients (*log-rank* $p = 0.002$ and *log-rank* $p = 0.001$, respectively). Our data indicate the possible use of the identified parameters as markers associated with the efficacy of adjuvant tamoxifen therapy.

The article contains 1 Figure, 10 References.

Keywords: estrogen-positive breast cancer, transforming growth factor β -1 (TGF- β 1), PI3K/Akt - signaling, tamoxifen, resistance, flow cytometry

For citation: Dronova TA, Babyshkina NN, Vtorushin SV, Cherdyntseva NV. The role of the TGF- β 1/PI3K/Akt mediated signaling pathway in the progression of estrogen-positive breast cancer. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2025;69:76-82. doi: 10.17223/19988591/69/9

Введение

Согласно практическим рекомендациям RUSSCO 2023 и NCCN 2023, всем больным гормонзависимым раком молочной железы (РМЖ) независимо от возраста, функции яичников, а также стадии заболевания показано проведение гормонотерапии в адъювантном режиме [1, 2]. Однако на данное лечение отвечает лишь часть пациенток (60–70%), у остальных (30–40%) возникает прогрессирование в виде отдаленных метастазов либо рецидива заболевания [3]. Развитию резистентности к гормонотерапии способствуют различные факторы, среди которых нарушение внутриклеточных сигналов трансформирующего фактора роста β 1 (TGF- β 1) и дальнейшая активация альтернативных сигнальных каскадов, таких как PI3K/Akt [4, 5]. Целью исследования явился анализ содержания белков TGF- β 1, TGF- β R1, TGF- β R2, pAkt1, циклин D1 и субпопуляций опухолевых клеток, коэкспрессирующих TGF- β 1/TGF- β R2, TGF- β R1/TGF- β R2, pAkt1/TGF- β R2 и циклин D1/TGF- β R2 в зависимости от ответа на проводимое лечение тамоксифеном.

Материалы и методы

Исследование проведено среди 65 пациенток с первично верифицированным диагнозом эстроген-позитивный рак молочной железы стадии T₁₋₄N₀₋₃M₀. Схема лечения включала оперативное хирургическое вмешательство, лучевую и/или химиотерапию по показаниям, а также курс адъювантной гормонотерапии тамоксифеном (5 лет, 20 мг/сут). На стадии операционного вмешательства (радикальная мастэктомия/ограносохраняющая операция) у каждой из пациенток взят образец опухолевой ткани молочной железы. Исходя из отдаленных результатов лечения, все пациентки разделены на 2 группы – чувствительная и резистентная к тамоксифену. В группе, чувствительной к тамоксифену, не отмечено прогрессирования заболевания ($N = 55$ (84,6%)); в группе, резистентной к проведенной терапии, отмечено наличие рецидива либо отдаленного метастазирования ($N = 10$ (15,4%)). Среднее время до прогрессирования РМЖ на фоне приема тамоксифена – $29,2 \pm 3,26$ месяца. Содержание белков и фенотипирование субпопуляций опухолевых клеток изучено с использованием проточного цитофлуориметра CytotFLEX (Beckman Coulter, США). Визуализация и количественная оценка исследуемых клеток проведены с помощью пакета программ CytExpert 2.0.0.152 (Becton Dickinson, США). Статистический анализ полученных результатов проведен с использованием программ «STATISTICA 9.0» и SPSS 21.0. Проверка соответствия анализируемых признаков нормальному закону распределения осуществлена при помощи

критерия согласия Колмогорова–Смирнова. Т-критерий Стьюдента (для выборок с нормальным распределением) и U-критерий Манна–Уитни (для выборок, не соответствующих нормальному закону) использованы для анализа количественных данных. Выживаемость без прогрессирования анализировали с использованием кривых Каплана–Мейера и log-rank-теста. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение

В ходе проведенного исследования проведен анализ содержания белков и субпопуляций опухолевых клеток, коэкспрессирующих анализируемые маркеры в зависимости от ответа на проводимое лечение препаратом тамоксифен.

Анализ содержания белков показал, что опухоли с высоким содержанием TGF- β R1 и TGF- β R2 преобладали среди пациенток, чувствительных к гормонотерапии ($p = 0,036$ и $p = 0,006$; соответственно, рис. 1). Высокий риск прогрессирования РМЖ на фоне тамоксифена связан с высоким содержанием в опухолевых клетках pAkt1 ($p = 0,024$, рис. 1).

Второй этап работы включал исследование популяций опухолевых клеток, коэкспрессирующих изучаемые маркеры, а именно: TGF- β 1+/TGF- β R2+, TGF- β 1-/TGF- β R2+, TGF- β 1-/TGF- β R2-, TGF- β 1+/TGF- β R2-, TGF- β R1+/TGF- β R2+, TGF- β R1-/TGF- β R2+, TGF- β R1-/TGF- β R2-, TGF- β R1+/TGF- β R2-, pAkt1+/TGF- β R2+, pAkt1-/TGF- β R2+, pAkt1-/TGF- β R2-, pAkt1+/TGF- β R2-, циклин D1+/TGF- β R2+, циклин D1-/TGF- β R2+, циклин D1-/TGF- β R2- и циклин D1+/TGF- β R2-. Наличие субпопуляций pAkt1+/TGF- β R2+ и циклин D1+/TGF- β R2- было связано с отсутствием ответа на гормонотерапию тамоксифеном ($p = 0,006$ и $p = 0,000$ соответственно). Напротив, высокое процентное содержание клеток pAkt1-/TGF- β R2+ и циклин D1+/TGF- β R2+ выявлено в опухолевой ткани пациенток с благоприятным ответом на лечение ($p = 0,001$ и $p = 0,003$ соответственно).

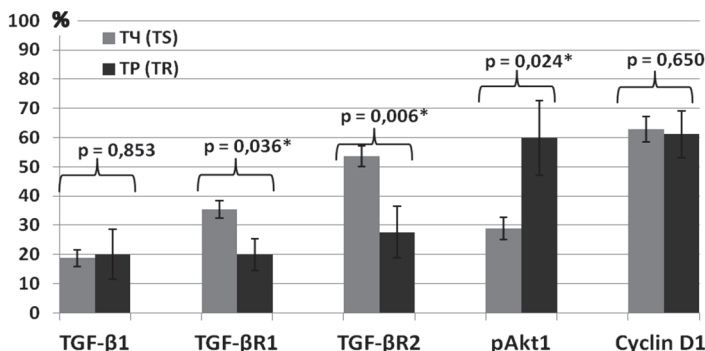


Рис. 1. Содержание TGF- β 1, TGF- β R1, TGF- β R2, pAkt1 и циклина D1 в опухолевой ткани в зависимости от эффективности тамоксифена.

ТЧ – тамоксифен-чувствительная группа, ТР – тамоксифен-резистентная группа
 [Fig. 1. On the X-axis - Proteins, on the Y-axis - Protein expression levels (percent). TGF- β 1, TGF- β R1, TGF- β R2, pAkt1 and cyclin D1 expression in tumor tissue depending on the efficacy of tamoxifen.
 TR - tamoxifen resistant, TS - tamoxifen sensitive groups]

На последнем этапе работы проведен анализ выживаемости без прогрессирования. Высокое процентное содержание клеток, экспрессирующих TGF- β R2 и pAkt1-/TGF- β R2+, отмечено среди больных с более длительным периодом выживаемости без прогрессирования (log-rank, $p = 0,006$ и log-rank, $p = 0,008$). Низкие показатели выживаемости наблюдались среди пациенток, имеющих высокий уровень белка pAkt1 и популяций pAkt1+/TGF- β R2+, pAkt1+/TGF- β R2- клеток в опухоли (log-rank, $p = 0,002$ и log-rank, $p = 0,001$ соответственно). Таким образом, показано, что обнаруженные маркеры обладают не только предсказательным, но и прогностическим потенциалом.

Согласно литературным данным, исследования, посвященные анализу связи белковых продуктов TGF- β R1, TGF- β R2, pAkt1 с ответом на адъювантную гормонотерапию тамоксифеном, немногочисленны. Отмечено низкое содержание TGF- β R2 среди пациенток, резистентных к терапии, находящихся в менопаузе [6]. Напротив, высокий процент экспрессии TGF- β R1 ассоциирован с эффективностью гормонотерапии среди пациенток с диагнозом эстроген-позитивный РМЖ [7]. Большая часть исследований, представленных в мировой литературе, посвящена изучению белка pAkt1, которые подтверждают его значимость как предсказательного, так и прогностического маркера. Так, неблагоприятный ответ на гормонотерапию отмечен среди пациенток, имеющих в опухолевой ткани молочной железы высокое содержание pAkt1, что полностью соответствует результатам нашей работы [8]. Кроме того, в работах других авторов подтверждена ассоциация между активацией pAkt1 и снижением общей выживаемости на фоне терапии тамоксифеном [9, 10]. Наиболее ценным из полученных нами результатов является предсказательная значимость процентного содержания циклин D1/TGF β R2 и pAkt1/TGF- β R2 клеток в опухолевой ткани РМЖ. Стоит отметить, что исследований об изучении субпопуляции клеток, коэкспрессирующих данные маркеры, в литературных источниках не представлено.

Заключение

Полученные результаты указывают на возможное использование выявленных параметров в качестве маркеров, ассоциированных с эффективностью адъювантной терапии тамоксифеном. Данными потенциальными маркерами являются: содержание белковых продуктов TGF- β R1, TGF- β R2, pAkt1, а также субпопуляции клеток, коэкспрессирующие pAkt1/TGF- β R2 и циклин D1/TGF- β R2.

Список источников

1. Тюляндин С.А., Артамонова Е.В., Жигулев А.Н., Жукова Л.Г., Королева И.А., Пароконная А.А. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака молочной железы. Практические рекомендации RUSSCO, часть 1 // Злокачественные опухоли. 2023. Т. 13, № 3s2. С. 157–200. doi: 10.18027 / 2224-5057-2023-13-3s2-1-157-200
2. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Guidelines for patient. 2023. URL: <https://www.nccn.org/patientresources/patient-resources/guidelines-for-patients/guidelines-for-patients-details?patientGuidelineId=30> (accessed: 12.10.2024).
3. Mishra A., Srivastava A., Pateriya A., Tomar M.S., Mishra A.K., Shrivastava A. Metabolic reprogramming confers tamoxifen resistance in breast cancer // Chemico-Biological Interactions. 2021. Vol. 347. 109602.

4. Deng Z., Fan T., Xiao C., Tian H., Zheng Y., Li Ch., He J. TGF-β signaling in health, disease, and therapeutics // *Sig Transduct Target Ther.* 2024. Vol. 9, № 61. PP. 1–40. doi: 10.1016/j.cbi.2021.109602
5. Zamanian M.Y., Golmohammadi M., Alalak A., Kamiab Z., Obaid R., Ramirez-Coronel A.A., HJazi A., Abosaooda M., Mustafa Y., Heidari M., Verma A., Nazari Y., Bazmondegan Ch. STAT3 Signaling Axis and Tamoxifen in Breast Cancer: A Promising Target for Treatment Resistance // *Anticancer Agents Med Chem.* 2022. Vol. 23, № 16. PP. 1819–1828. doi: 10.2174/1871520623666230713101119
6. Busch S., Sims A.H., Stal O., Ferno M., Landberg G. Loss of TGFβ receptor type 2 expression impairs estrogen response and confers tamoxifen resistance // *Cancer Res.* 2015. Vol. 75, № 7. PP. 1457–1469. doi: 10.2174/1871520623666230713101119
7. Babyshkina N., Dronova T., Vtorushin S., Patalyak S., Cherdyntseva N. ERα heterogeneous expression and the TGF-βRI status in the tumour predicted tamoxifen resistance // *Ann. Oncol.* 2021. Vol. 32, № 1. S18–S19. doi: 10.1016/j.annonc.2021.01.061
8. Bostner J., Karlsson E., Pandiyan M.J., Westman H., Skoog L., Fornander T., Nordensjöld D., Stal O. Activation of Akt, mTOR, and the estrogen receptor as a signature to predict tamoxifen treatment benefit // *Breast Cancer Res Treat.* 2013. Vol. 137, № 2. PP. 397–406. doi: 10.1007/s10549-012-2376-y
9. Kirkegaard T., Witton C.J., McGlynn L.M., Tovey S.M., Dunne B., Lyon A., Bartlett J.M.S. AKT activation predicts outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen // *J Pathol.* 2005. Vol. 207, № 2. PP. 139–146. doi: 10.1002/path.1829
10. Agthoven T., Godinho M.F., Wulfschuhle J.D., Petricoin E.F., Dorsses L.C.J. Protein pathway activation mapping reveals molecular networks associated with antiestrogen resistance in breast cancer cell lines // *Int J Cancer.* 2012. Vol. 131, № 9. PP. 1998–2007.

References

1. Tyulyandin SA, Artamonova EV, Zhigulev AN, Zhukova LG, Koroleva IA, Parokonnaya AA. Prakticheskie rekomendacii po lekarstvennomu lecheniyu raka molochnoj zhelezy. Prakticheskie rekomendacii RUSSCO, chast' 1 [Practical recommendations for drug treatment of breast cancer. Practical recommendations RUSSCO, part 1]. *Zlokačestvennye opuholi.* 2023;13(3s2):157-200. doi: 10.18027 / 2224-5057-2023-13-3s2-1-157-200. In Russian
2. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Guidelines for patient. 2023 [Electronic resource]. Available at: <https://www.nccn.org/patientresources/patient-resources/guidelines-for-patients/guidelines-for-patients-details?patientGuidelineId=30> (accessed 12.10.2024).
3. Mishra A, Srivastava A, Pateriya A, Tomar MS, Mishra AK, Shrivastava A. Metabolic reprogramming confers tamoxifen resistance in breast cancer. *Chemico-Biological Interactions.* 2021;347:109602.
4. Deng Z, Fan T, Xiao C, Tian H, Zheng Y, Li Ch, He J. TGF-β signaling in health, disease, and therapeutics. *Sig Transduct Target Ther.* 2024;9(61):1-40. doi: 10.1016/j.cbi.2021.109602
5. Zamanian MY, Golmohammadi M, Alalak A, Kamiab Z, Obaid R, Ramirez-Coronel AA, HJazi A, Abosaooda M, Mustafa Y, Heidari M, Verma A, Nazari Y, Bazmondegan Ch. STAT3 Signaling Axis and Tamoxifen in Breast Cancer: A Promising Target for Treatment Resistance. *Anticancer Agents Med Chem.* 2022;23(16):1819-1828. doi: 10.2174/1871520623666230713101119
6. Busch S, Sims AH, Stal O, Ferno M, Landberg G. Loss of TGFβ receptor type 2 expression impairs estrogen response and confers tamoxifen resistance. *Cancer Res.* 2015;75(7):1457-1469. doi: 10.2174/1871520623666230713101119
7. Babyshkina N, Dronova T, Vtorushin S, Patalyak S, Cherdyntseva N. ERα heterogeneous expression and the TGF-βRI status in the tumour predicted tamoxifen resistance. *Ann. Oncol.* 2021;32(1): S18-S19. doi: 10.1016/j.annonc.2021.01.061
8. Bostner J, Karlsson E, Pandiyan MJ, Westman H, Skoog L, Fornander T, Nordensjöld D, Stal O. Activation of Akt, mTOR, and the estrogen receptor as a signature to predict

- tamoxifen treatment benefit. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;137(2):397-406. doi: 10.1007/s10549-012-2376-y
9. Kirkegaard T, Witton CJ, McGlynn LM, Tovey SM, Dunne B, Lyon A, Bartlett JMS. AKT activation predicts outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *J Pathol.* 2005;207(2):139-146. doi: 10.1002/path.1829
 10. Agthoven T, Godinho MF, Wulfschuhle JD, Petricoin EF, Dorsses LCJ. Protein pathway activation mapping reveals molecular networks associated with antiestrogen resistance in breast cancer cell lines. *Int J Cancer.* 2012;131(9):1998-2007.

Информация об авторах:

Дронова Татьяна Анатольевна, м.н.с. лаборатории молекулярной онкологии и иммунологии НИИ онкологии Томского НИМЦ (Томск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3009-2404>

E-mail: tanyadronova@mail.ru

Бабышкина Наталия Николаевна, д-р мед. наук, в.н.с. лаборатории молекулярной онкологии и иммунологии НИИ онкологии Томского НИМЦ (Томск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0562-3878>

E-mail: nbabyshkina@mail.ru

Вторушин Сергей Владимирович, д-р мед. наук, проф., заведующий отделением общей и молекулярной патологии НИИ онкологии Томского НИМЦ (Томск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1195-4008>

E-mail: wtorushin@rambler.ru

Чердынцева Надежда Викторовна, д-р биол. наук, проф., член-корр. РАН, заведующий лабораторией молекулярной онкологии и иммунологии НИИ онкологии Томского НИМЦ (Томск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1526-901>

E-mail: nvch@tnimc.ru

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Information about the authors:

Tatyana A. Dronova, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Oncology and Immunology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (Tomsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3009-2404>

E-mail: tanyadronova@mail.ru

Nataliya N. Babyshkina, Dr.Sci (Med.), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Oncology and Immunology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (Tomsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0562-3878>

E-mail: nbabyshkina@mail.ru

Sergey V. Vtorushin, Dr.Sci (Med.), Professor, Head of the Department of General and Molecular Pathology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (Tomsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1195-4008>

E-mail: wtorushin@rambler.ru

Nadezhda V. Cherdyntseva, Dr.Sci (Biol.), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Professor, Head of the Laboratory of Molecular Oncology and Immunology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (Tomsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1526-901>

E-mail: nvch@tnimc.ru

The Authors declare no conflict of interest.

*Статья поступила в редакцию 16.10.2024;
одобрена после рецензирования 25.10.2024; принята к публикации 03.03.2025.*

*The article was submitted 16.10.2024;
approved after reviewing 25.10.2024; accepted for publication 03.03.2025.*

Научная статья

УДК 579.64

doi: 10.17223/19988591/69/10

Клинический случай: новый вариант в сайте сплайсинга гена *SPAST* при аутосомно-доминантной спастической параплегии 4-го типа

**Ирина Жаргаловна Жалсанова¹, Елизавета Алексеевна Фонова²,
Наиль Раушанович Валияхметов³, Софья Николаевна Государкина⁴,
Елизавета Юрьевна Петлина⁵, Гульнара Наримановна Сеитова⁶,
Вадим Анатольевич Степанов⁷, Николай Алексеевич Скрыбин⁸**

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 Томский национальный исследовательский медицинский центр
Российской академии наук, Томск, Россия

¹ irina.zhalsanova@medgenetics.ru

Аннотация. Наследственные спастические параплегии представляют собой группу клинически и генетически разнообразных нейродегенеративных наследственных болезней. Заболевание преимущественно проявляется прогрессирующей спастичностью и слабостью нижних конечностей. Патогенные варианты гена *SPAST* являются наиболее распространенной причиной наследственных спастических параплегий. Описан клинический случай мужчины 53 лет с изменением походки, постоянными болями внизу живота и в пояснице, особенно при физической нагрузке. Таргетное секвенирование нового поколения выявило новый, вероятно, патогенный вариант в сайте сплайсинга гена *SPAST* – с.1173+1G > C. Этот вариант нарушает канонический сайт сплайсинга, и прогнозируется, что он значительно нарушает структуру белка. Таким образом, этот новый вариант в сайте сплайсинга расширяет круг патогенных вариантов, приводящих к наследственной спастической параплегии 4-го типа, предоставляя возможность дальнейшего изучения патогенеза данного заболевания.

Ключевые слова: наследственные спастические параплегии, нейродегенеративные наследственные заболевания, *SPAST*, секвенирование нового поколения, сплайсинг

Источник финансирования: работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Федеральная научно-технологическая программа развития генетических технологий на 2019–2027 гг., договор 075-15-2021-1061, РФ 193021X0029).

Для цитирования: Жалсанова И.Ж., Фонова Е.А., Валияхметов Н.Р., Государкина С.Н., Петлина Е.Ю., Сеитова Г.Н., Степанов В.А., Скрыбин Н.А. Клинический случай: новый вариант в сайте сплайсинга гена *SPAST* при аутосомно-доминантной спастической параплегии 4-го типа // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2025. № 69. С. 83–92. doi: 10.17223/19988591/69/10

Case Report: a novel splice variant of *SPAST* gene in autosomal dominant spastic paraplegia, type 4

Irina Zh. Zhalsanova¹, Elizaveta A. Fonova², Nail R. Valiakhmetov³,
Sofia N. Gosudarkina⁴, Elizaveta Yu. Petlina⁵, Gulnara N. Seitova⁶,
Vadim A. Stepanov⁷, Nikolay A. Skryabin⁸

^{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8} Research Institute of Medical Genetics,

Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

¹ irina.zhalsanova@medgenetics.ru

Summary. Hereditary spastic paraplegia is a clinically and genetically heterogeneous group of rare neurodegenerative diseases that is characterized by slowly progressive spasticity and weakness in the lower limbs. The prevalence of the disease reaches 1-5 cases per 100,000 populations. Clinically, the disease is divided into pure and complicated spastic paraplegia. Pure spastic paraplegia is mainly characterized by slowly progressive weakness and spasticity of the lower limbs. Complicated spastic paraplegia includes leg spasticity, optic neuropathy, retinopathy, extrapyramidal dysfunction, dementia, ataxia, ichthyosis, mental retardation and deafness. Spastic paraplegia, type 4 onset age ranges from early childhood to 70 years of age. Spastic paraplegia, type 4 is the most common form of autosomal dominant inherited spastic paraplegia, accounting for up to 45% of cases. The spastic paraplegia, type 4 is caused by a heterozygous mutation in the *SPAST* gene. It is known that pathogenic variants of the *SPAST* gene tend to cause pure spastic paraplegia, type 4 and are more common in men than in women. The *SPAST* gene is located on chromosome 2p22.3 and contains 17 exons. The *SPAST* gene encodes the Spasin protein, a member of the ATPase family of proteins associated with diverse cellular activities (AAA). We describe the case of a 53-year-old man with the main complaints of changes in gait, constant pain in the lower abdomen, as well as pain in the lower back, especially during physical activity. When the patient was 48 years old, he first felt pain in his lower back, which he associated with physical activity, and consulted a neurologist. Based on the results of an examination conducted by a neurologist, degenerative changes in the lumbar spine were identified. He underwent surgical treatment in hospital. The patient with chronic low back pain received an 80 C radiofrequency lesion of the dorsal ramus of the L3-L4 and L4-L5 segmental nerve roots. However, the low back pain persisted. He did not seek medical attention until 2022. The patient returned to the doctor due to persistent back pain. According to the medical data, the neurologists noted this symptom, as well as an increase in muscle tone in 2022. The neurologist diagnosed hereditary spastic paraplegia with walking impairment due to muscle tone. According to the Modified Ashworth Scale, the patient has 3/5 points: significant increase in muscle tone, passive movement difficult. Targeted next-generation sequencing identified a new likely pathogenic splice variant of the *SPAST* gene - c.1173+1G > C. The variant disrupts a canonical splice site and is therefore predicted to significantly disrupt the protein structure. This nucleotide sequence variant has not been described previously, but a pathogenic one has been described at the same location (c.1173+1G > A). According to ACMG criteria, the variant should be considered as likely pathogenic (PM2, PVS1, PP3). We tested the pathogenicity of the variant using the SpliceAI program. The probability that the position 2:32127023 (= 32127023 - 75) is used as a splice acceptor decreases by delta score 0.93. The probability that the position 2:32127023 (= 32127023 - 1) is used as a splice donor decreases by delta score 0.89, confirming the classification of the variant in the direction of its pathogenicity. The majority of pathogenic variants in a *SPAST* gene are LOF variants

(nonsense mutations; open reading frameshift mutations; changes in the canonical (± 1 or ± 2) splice site nucleotides) leading to NMD (nonsense-mediated decay of mRNA), are located in AAA domain. Splice variants, like all LOF variants, produce a truncated protein and lead to unstable aberrant transcripts that can result in reduced spastin. It is known that the frequency of spastic paraplegia, type 4 splice site mutations (28%) is significantly higher than reported in studies of other human genetic disorders, where 15% of mutations were found to affect mRNA splicing.

Thus, this new splice variant expands the range of pathogenic variants leading to spastic paraplegia, type 4, providing an opportunity for further study of the pathogenesis of this disease.

The article contains 3 Figures, 9 References.

Keywords: hereditary spastic paraplegia, neurodegenerative hereditary diseases, SPAST, next generation sequencing, splicing

Fundings: This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (the Federal Scientific-technical program for genetic technologies development for 2019–2027, agreement. 075-15-2021-1061, RF 193021X0029).

For citation: Zhalsanova IZh, Fonova EA, Valiakmetov NR, Gosudarkina SN, Petlina EYu, Seitova GN, Stepanov VA, Skryabin NA. Case report: a novel splice variant of *SPAST* gene in autosomal dominant spastic paraplegia type 4. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2025;69:83-92. doi: 10.17223/19988591/69/10

Введение

Наследственная спастическая параплегия (НСП) – клинически и генетически гетерогенная группа редких нейродегенеративных заболеваний, характеризующаяся медленно прогрессирующей спастичностью и слабостью в нижних конечностях. Распространенность заболевания достигает 1–5 случаев на 100 000 населения [1]. Клинически можно выделить две формы заболевания: неосложнённая «чистая» и осложненная – спастические параплегии. Чистая НСП характеризуется преимущественно медленно прогрессирующей слабостью и спастичностью нижних конечностей. Осложненная НСП включает в себя сопутствующие неврологические и/или экстра-неврольные симптомы в разных сочетаниях: спастичность ног, нейропатию зрительного нерва, ретинопатию, экстрапирамидную дисфункцию, деменцию, атаксию, ихтиоз, умственную отсталость и глухоту. Существуют различные типы наследования НСП: аутосомно-доминантный, аутосомно-рецессивный и X-сцепленный. Наиболее распространенный тип наследования – аутосомно-доминантный – около 70% случаев [2]. Спастическая параплегия 4-го типа (НСП4) является наиболее распространенной формой аутосомно-доминантного наследования НСП, составляя до 45% случаев [3]. НСП4 вызван гетерозиготной мутацией гена *SPAST* на хромосоме 2p22. Известно, что патогенные варианты гена *SPAST* склонны вызывать чистый НСП4 и чаще встречаются у мужчин, чем у женщин [4]. Цель работы заключалась в постановке молекулярно-генетического анализа пациенту с клиническими проявлениями НСП4.

Материалы и методы

Для таргетного секвенирования ДНК, полученную из лимфоцитов периферической крови пациента, анализировали на приборе нового поколения MiSeq Sequencing System (Illumina) со средним покрытием $\times 78$. Для пробоподготовки использовали целевое обогащение с использованием набора Agilent Sure Select XT (Agilent, США). Панель таргетного секвенирования включала 28 генов с известной клинической значимостью (*NF1*, *PAH*, *IDUA*, *IDS*, *SMN1*, *SMN2*, *MFN2*, *DMD*, *CLCN1*, *TSC1*, *TSC2*, *FBN1*, *SERPING1*, *F12*, *PLG*, *SPAST*, *KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *CFTR*, *FGFR1*, *FGFR2*, *COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL5A1*, *ADAMTS2*, *ATP7B*). Диагностическая панель разработана лабораторией с учетом потребностей врачей генетической клиники.

Обработка данных секвенирования проведена согласно best practices GATK для «Germline SNPs Indels» с использованием набора программ GATK4. Оценка качества прочтений осуществлялась с помощью программы Qualimap. Выравнивание прочтений на референсную последовательность генома человека (GRCh38/hg38) осуществлялось с помощью BWA. Для аннотирования использовалась программа Annovar. Для оценки популяционных частот выявленных вариантов использованы выборки проектов gnomAD. Для оценки клинической релевантности выявленных вариантов использованы база данных OMIM и литературные данные. Длина чтения 2x151 п.н. Всего прочтений: 27 508 прямых и столько же обратных. Медианная надежность определения нуклеотидов выше Q30. Влияние варианта на сплайсинг определялось с помощью инструмента SpliceAI.

Секвенирование по Сэнгеру вокруг идентифицированного варианта выполнено у пациента в обоих направлениях. Для амплификации ДНК варианта chr2:32127023G > C выбраны следующие праймеры для ПЦР: прямой – GTAATCCTCCTGTCTTTGCC; обратный – GCCCAGATCACTCAAAACAA. ПЦР проводили с использованием набора BioMaster HS-TaQ PCR-Color («Биолабмикс», Россия). Реакцию секвенирования проводили с использованием набора BrilliantDye Terminator Cycle Sequencing v3.1 (NimaGen, Нидерланды). Продукты секвенирования очищали с использованием набора D-Pure DyeTerminator Cleanup Kit (NimaGen, Нидерланды), осаждение ЭДТА/этанолам. Секвенирование проводили с использованием генетического анализатора Applied Biosystems 3730 (Thermo Fisher Scientific, США).

Результаты исследования

Клинический случай. Мужчина, 53 года, обратился в Генетическую клинику с основными жалобами на изменение походки, постоянные боли внизу живота, а также боли в пояснице, особенно при физической нагрузке. Впервые он почувствовал боль в пояснице, которую связал с физической нагрузкой, в возрасте 48 лет, после чего обратился к неврологу. По результатам обследования у пациента выявлены дегенеративные изменения поясничного отдела позвоночника. Во время госпитализации в 2019 г. проведено

оперативное лечение – высокочастотная денервация фасеточных суставов L3–L4, L4–L5, однако боль в пояснице сохранялась. Пациент вновь обратился к врачу в 2022 г. из-за непрекращающихся болей в спине, также отмечено повышение тонуса мышц конечностей. По модифицированной шкале Эшворта у больного наблюдается 3/5 баллов: значительное повышение мышечного тонуса, затруднение пассивных движений [5]. На приеме у врача-генетика в 2023 г. выраженных фенотипических особенностей не выявлено. При осмотре у невролога Генетической клиники отмечено, что изменения походки сохраняются (спастические с обеих сторон, «на прямых ногах»), асимметричные рефлексы, гиперрефлексия, расширение рефлексогенных зон, пирамидные знаки в руках, изменение мышечного тонуса спастического типа при движении.

Согласно генеалогическому дереву, сходные симптомы (изменения походки, мышечная слабость) наблюдались у отца, тети и двоюродных братьев по отцовской линии (рис. 1). Однако в настоящее время пациент с ними не контактирует.

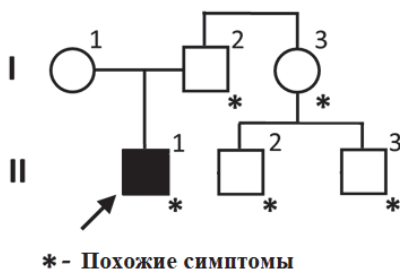


Рис. 1. Родословная пациента
[Fig. 1. Pedigree of patient (IGV browser)]

Таргетное секвенирование пациента выявило вариант с.1173+1G > C в гене *SPAST* в гетерозиготном состоянии. Данный вариант нуклеотидной последовательности располагается в донорном сайте сплайсинга 8 экзона гена *SPAST* (chr2:g.32127023G > C) (рис. 2).

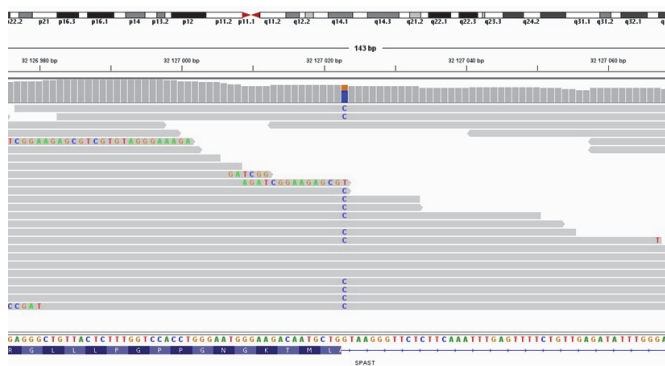


Рис. 2. NGS секвенс (IGV browser)
[Fig. 2. NGS sequencing (IGV browser)]

Этот вариант нарушает канонический сайт сплайсинга и, следовательно, прогнозируется, что он значительно нарушает структуру белка. Этот вариант нуклеотидной последовательности не описан, но ранее был описан патогенный вариант в этой же позиции (с.1173+1G > A). По критериям ACMG вариант следует рассматривать как вероятно патогенный (PM2, PVS1, PP3). Патогенность варианта проверяли с помощью программы SpliceAI. Вероятность того, что позиция 2:32127023 (= 32127023 – 75) используется в качестве акцептора сплайсинга, уменьшается на дельта-оценку 0,93. Вероятность того, что позиция 2:32127023 (= 32127023 – 1) используется в качестве донора сплайсинга, уменьшается на дельта-оценку 0,89. Дельта-оценка варианта варьируется от 0 до 1 и может интерпретироваться как вероятность того, что вариант изменяет сплайсинг. В статье дана подробная характеристика пороговых значений 0,2 (высокая полнота), 0,5 (рекомендуемый) и 0,8 (высокая точность) [6].

Секвенирование по Сэнгеру подтвердило наличие варианта chr2:32127023G > C у пациента (рис. 3).

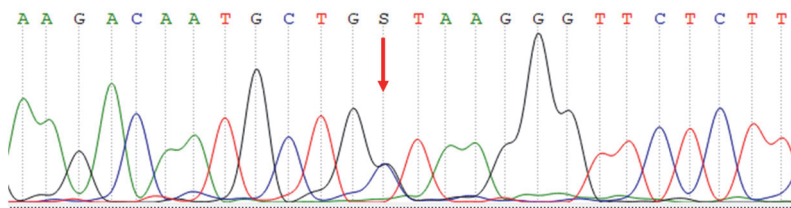


Рис. 3. Секвенирование пациента по Сэнгеру. Генетический вариант chr2:32127023G > C в каноническом сайте сплайсинга экзона 8 гена *SPAST*
[Fig. 3. Patient Sanger sequencing. Genetic variant chr2:32127023G > C in canonical splice site of exon 8 in *SPAST* gene]

Обсуждение

Ген *SPAST* состоит из 90 т.п.н., содержит 17 экзонов и кодирует белок спастин, член семейства АТФаз, который связан с широким спектром клеточной активности и играет роль в динамике микротрубочек. Спастин содержит четыре функциональных домена, наиболее интересным из которых является четвертый домен ААА, который участвует в гексамеризации спастина, активности разрыва микротрубочек и гидролизе АТФ.

Большинство патогенных вариантов гена *SPAST* представляют собой варианты LOF (Loss Of Function – потеря функции) (нонсенс-мутации; мутации сдвига рамки считывания; изменения в канонических (± 1 или ± 2) нуклеотидах сайта сплайсинга), приводящие к NMD (Nonsense Mediated Decay – нонсенс-опосредованному распаду мРНК) в домене ААА. Варианты сплайсинга, как и все варианты LOF, производят усеченный белок и приводят к нестабильным aberrантным транскриптам, что может привести к снижению уровня белка. Известно, что частота мутаций сайта сплайсинга НСП4 (28%) значительно выше, чем сообщалось в исследованиях других

генетических нарушений человека, где обнаружено, что 15% мутаций влияют на сплайсинг мРНК [7]. В большинстве случаев варианты LOF приводят к более тяжелому течению заболевания. Показано, что миссенс-варианты, влияющие на домен AAA, приводят к конститутивному связыванию спастина с микротрубочками, что указывает на доминантно-негативный механизм. Исследования показали, что миссенс-варианты связаны с более ранним началом, а чистые варианты LOF – с более поздним началом.

Что касается сплайс-вариантов гена *SPAST*, то в большинстве случаев клинические особенности пациента характерны для чистого НСП4 [8]. Клинические особенности нашего пациента согласуются с литературными данными о пациентах с мутациями сплайсинга в этой позиции. Варианты сплайсинга с.1173+1G > A и с.1173+2dup были идентифицированы у пациентов с чистым НСП4 [9].

Заключение

Таким образом, в AAA-домене гена *SPAST*, регионе, где находится большинство идентифицированных ранее вариантов, идентифицирован новый, вероятно, патогенный вариант, который отвечает за чистый НСП4, что подтверждает литературные данные. Для пациента установлен клинический и генетический диагноз, который позволит в дальнейшем скорректировать тактику лечения, а также прибегнуть к первичной или вторичной профилактике наследственного заболевания в семье пациента. Будущие исследования должны выяснить роль типа мутации, чтобы лучше понять корреляцию между генотипами и фенотипами.

Список источников

1. Panza E., Meyyazhagan A., Orlacchio A. Hereditary spastic paraplegia: Genetic heterogeneity and common pathways // *Exp Neurol*. 2022. Vol. 357. 114203. doi: 10.1016/j.expneurol.2022.114203
2. Fei Q.Z., Tang W.G., Rong T.Y., Tang H.D., Liu J.R., Guo Z.L., Fu Y., Xiao Q., Wang X.J., He S.B., Cao L., Chen S.D. Two novel mutations in the Spastin gene of Chinese patients with hereditary spastic paraplegia // *Eur J. Neurol*. 2011. Vol. 18. PP. 1194–1196. doi: 10.1111/j.1468-1331.2011.03358.x
3. Hazan J., Fonknechten N., Mavel D., Paternotte C., Samson D., Artiguenave F., Davoine C.S., Cruaud C., Dürr A., Wincker P., Brottier P., Cattolico L., Barbe V., Burgunder J.M., Prud'homme J.F., Brice A., Fontaine B., Heilig B., Weissenbach J. Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia // *Nat Genet*. 1999. Vol. 23. PP. 296–303. doi: 10.1038/15472
4. Yu W., Jin H., Deng J., Nan D., Huang Y. A novel *SPAST* gene mutation identified in a Chinese family with hereditary spastic paraplegia // *BMC Med Genet*. 2020. Vol. 21. PP. 1–7. doi: 10.1186/s12881-020-01053-7
5. Harb A., Kishner S. Modified Ashworth Scale // *StatPearls*. StatPearls Publishing, 2023.
6. Jaganathan K., Kyriazopoulou Panagiotopoulou S., McRae J.F., Darbandi S.F., Knowles D., Li Y.I., Kosmicki J.A., Arbelaez J., Cui W., Schwartz G.B., Chow E.D., Kanterakis E., Gao H., Kia A., Batzoglu S., Sanders S.J., Farh K.K. Predicting Splicing from Primary Sequence with Deep Learning // *Cell*. 2019. Vol. 176. PP. 535–548.e24. doi: 10.1016/j.cell.2018.12.015

7. Fonknechten N., Mavel D., Byrne P., Davoine C.S., Cruaud C., Bönsch D., Samson D., Coutinho P., Hutchinson M., McMonagle P., Burgunder J.M., Tartaglione A., Heinzlef O., Feki I., Deufel T., Parfrey N., Brice A., Fontaine B., Prud'homme J.F., Weissenbach J., Dürr A., Hazan J. Spectrum of *SPG4* mutations in autosomal dominant spastic paraplegia // *Hum Mol Genet.* 2000. Vol. 9. PP. 637–644. doi: 10.1093/hmg/9.4.637
8. Parodi L., Fenu S., Barbier M., Banneau G., Duyckaerts C., Tezenas du Montcel S., Monin M.L., Ait Said S., Guegan J., Tallaksen C.M.E., Sablonniere B., Brice A., Stevanin G., Depienne C., Durr A. SPATAX network. Spastic paraplegia due to *SPAST* mutations is modified by the underlying mutation and sex // *Brain.* 2018. Vol. 141. PP. 3331–3342. doi: 10.1093/brain/awy285
9. Mészárosová A., Putzová M., Čermáková M., Vávrová D., Doležalová K., Smetanová I., Stejskal D., Beetz C., Seeman P. *SPAST* mutation spectrum and familial occurrence among Czech patients with pure hereditary spastic paraplegia // *J. Hum Genet.* 2016. Vol. 61. PP. 845–850. doi: 10.1038/jhg.2016.73

References

1. Panza E, Meyyazhagan A, Orlacchio A. Hereditary spastic paraplegia: Genetic heterogeneity and common pathways. *Exp Neurol.* 2022;357:114203. doi: 10.1016/j.expneurol.2022.114203
2. Fei QZ, Tang WG, Rong TY, Tang HD, Liu JR, Guo ZL, Fu Y, Xiao Q, Wang XJ, He SB, Cao L, Chen SD. Two novel mutations in the Spastin gene of Chinese patients with hereditary spastic paraplegia. *Eur J Neurol.* 2011;18(9):1194-1196. doi: 10.1111/j.1468-1331.2011.03358.x
3. Hazan J, Fonknechten N, Mavel D, Paternotte C, Samson D, Artiguenave F, Davoine CS, Cruaud C, Dürr A, Wincker P, Brottier P., Cattolico L, Barbe V, Burgunder JM, Prud'homme JF, Brice A, Fontaine B, Heilig B, Weissenbach J. Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia. *Nat Genet.* 1999;23(3):296-303. doi: 10.1038/15472
4. Yu W, Jin H, Deng J, Nan D, Huang Y. A novel SPAST gene mutation identified in a Chinese family with hereditary spastic paraplegia. *BMC Med Genet.* 2020;21(1):1-7. doi: 10.1186/s12881-020-01053-7
5. Harb A, Kishner S. Modified Ashworth Scale. StatPearls. StatPearls Publishing; 2023.
6. Jaganathan K, Kyriazopoulou Panagiotopoulou S, McRae JF, Darbandi SF, Knowles D, Li YI, Kosmicki JA, Arbelaez J, Cui W, Schwartz GB, Chow ED, Kanterakis E, Gao H, Kia A, Batzoglu S, Sanders SJ, Farh KK. Predicting Splicing from Primary Sequence with Deep Learning. *Cell.* 2019;176(3):535-548.e24. doi: 10.1016/j.cell.2018.12.015
7. Fonknechten N, Mavel D, Byrne P, Davoine CS, Cruaud C, Bönsch D, Samson D, Coutinho P, Hutchinson M, McMonagle P, Burgunder JM, Tartaglione A, Heinzlef O, Feki I, Deufel T, Parfrey N, Brice A, Fontaine B, Prud'homme JF, Weissenbach J, Dürr A, Hazan J. Spectrum of SPG4 mutations in autosomal dominant spastic paraplegia. *Hum Mol Genet.* 2000;9(4):637-644. doi: 10.1093/hmg/9.4.637
8. Parodi L, Fenu S, Barbier M, Banneau G, Duyckaerts C, Tezenas du Montcel S, Monin ML, Ait Said S, Guegan J, Tallaksen CME, Sablonniere B, Brice A, Stevanin G, Depienne C, Durr A, SPATAX network. Spastic paraplegia due to *SPAST* mutations is modified by the underlying mutation and sex. *Brain.* 2018;141(11):3331-3342. doi: 10.1093/brain/awy285
9. Mészárosová A, Putzová M, Čermáková M, Vávrová D, Doležalová K, Smetanová I, Stejskal D, Beetz C, Seeman P. *SPAST* mutation spectrum and familial occurrence among Czech patients with pure hereditary spastic paraplegia. *J Hum Genet.* 2016;61(10):845-850. doi: 10.1038/jhg.2016.73

Информация об авторах:

Жалсанова Ирина Жаргаловна, м.н.с. лаборатории геномики орфанных болезней НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (Томск, Россия).

E-mail: irina.zhalsanova@medgenetics.ru

Фонова Елизавета Алексеевна, м.н.с. лаборатории геномики орфанных болезней НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (Томск, Россия).

E-mail: fonova.elizaveta@medgenetics.ru

Валиахметов Наиль Раушанович, м.н.с. лаборатории популяционной генетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (Томск, Россия).

E-mail: nail.valiakhmetov@medgenetics.ru

Государкина Софья Николаевна, м.н.с. лаборатории геномики орфанных болезней НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (Томск, Россия).

E-mail: sophia.gosudarkina@medgenetics.ru

Петлина Елизавета Юрьевна, врач-невролог МГЦ «Генетическая клиника» НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (Томск, Россия).

E-mail: elisaveta.petlina@medgenetics.ru

Сеитова Гульнара Наримановна, канд. мед. наук, врач-генетик высшей категории, главный врач МГЦ «Генетическая клиника» НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (Томск, Россия).

E-mail: gulnara.seitovamedgenetics.ru

Степанов Вадим Анатольевич, д-р биол. наук, профессор, академик РАН, директор Томского НИМЦ, руководитель лаборатории эволюционной генетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (Томск, Россия).

E-mail: vadim.stepanov@medgenetics.ru

Скрябин Николай Алексеевич, канд. мед. наук, руководитель лаборатории геномики орфанных болезней НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (Томск, Россия).

E-mail: nikolay.skryabin@medgenetics.ru

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Information about the authors:

Irina Zh. Zhalsanova, Junior Research, Laboratory of Genomics of Rare Diseases, Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center (Tomsk, Russia).

E-mail: irina.zhalsanova@medgenetics.ru

Elizaveta A. Fonova, Junior Research, Laboratory of Genomics of Rare Diseases, Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center (Tomsk, Russia).

E-mail: fonova.elizaveta@medgenetics.ru

Nail R. Valiakhmetov, Junior Research, Laboratory of Population Genetics, Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center (Tomsk, Russia).

E-mail: nail.valiakhmetov@medgenetics.ru

Sofia N. Gosudarkina, Junior Research, Laboratory of Genomics of Rare Diseases, Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center (Tomsk, Russia).

E-mail: sophia.gosudarkina@medgenetics.ru

Elizaveta Yu. Petlina, Neurologist, "Genetic Clinic" Medical Genetic Center, Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center (Tomsk, Russia).

E-mail: elisaveta.petlina@medgenetics.ru

Gulnara N. Seitova, Cand. Sci. (Med.), Chief Geneticist, Head of "Genetic Clinic" Medical Genetic Center, Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center (Tomsk, Russia).

E-mail: gulnara.seitova@medgenetics.ru

Vadim A. Stepanov, Dr. of Biol. Sci., Professor, Academician of the RAS, Director of Tomsk National Research Medical Center, Head of Laboratory of Evolutionary Genetics, Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center (Tomsk, Russia).

E-mail: vadim.stepanov@medgenetics.ru

Nikolay A. Skryabin, Cand. Sci. (Med.), Head of Laboratory of Genomics of Rare Diseases, Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical (Tomsk, Russia).
E-mail: nikolay.skryabin@medgenetics.ru

The Authors declare no conflict of interest.

*Статья поступила в редакцию 25.08.2024;
одобрена после рецензирования 4.10.2024; принята к публикации 03.03.2025.*

*The article was submitted 25.08.2024;
approved after reviewing 4.10.2024; accepted for publication 03.03.2025.*

Научная статья

УДК 575.224.4:575.224.4:577.218

doi: 10.17223/19988591/69/11

Сравнительный анализ аномалий метилома хориона при различных патологиях беременности

Зуев Андрей Сергеевич¹, Шевцов Даниил Геннадьевич²,
Васильева Оксана Юрьевна³, Деменева Виктория Вадимовна⁴,
Саженова Елена Александровна⁵, Толмачева Екатерина Николаевна⁶,
Никитина Татьяна Владимировна⁷, Васильев Станислав Анатольевич⁸

^{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8} НИИ медицинской генетики, Томский национальный исследовательский
медицинский центр, Томск, Россия

^{2, 8} Национальный исследовательский Томский государственный университет,
Томск, Россия

¹ <https://orcid.org/0000-0001-9474-9335>, andrew.zuev@medgenetics.ru

Аннотация. Метилирование ДНК играет важную роль в развитии плаценты и физиологичном протекании беременности. Аномалии метилома плацентарных тканей могут приводить к различным патологическим состояниям и, в частности, были показаны при спонтанном аборте, преэклампсии и гестационном сахарном диабете. В данной работе был проведен сравнительный анализ профилей метилирования ДНК между рассматриваемыми патологиями в клетках ворсин хориона I и III триместров. Среди дифференциально-метилованных генов (ДМГ) при спонтанном аборте, преэклампсии и гестационном сахарном диабете были обнаружены 7 ДМГ, общих для всех рассматриваемых нозологий (3 гипометилированных, 3 гиперметилованных и 1 с различным направлением метилирования в разных частях гена). Кроме того, при спонтанном аборте было выявлено 114 уникальных ДМГ, не встречающихся при других патологиях беременности (33 гипометилированных и 81 гиперметилованный). Функциональная аннотация выявленных уникальных ДМГ указывает на их потенциальную вовлеченность в патогенез невынашивания беременности, а некоторые из них могут быть напрямую связаны с эмбриональной гибелью – *LRRC8A*, *HDLBP*, *HIC1* и *ST14*. Дальнейшие исследования выявленных дифференциально-метилованных генов могут иметь важное прогностическое и диагностическое значение в области акушерства и репродуктивных технологий.

Ключевые слова: метилирование ДНК, хорион, спонтанный аборт, преэклампсия, гестационный сахарный диабет, дифференциально метилированные гены

Источник финансирования: работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 23-15-00341.

Для цитирования: Зуев А.С., Шевцов Д.Г., Васильева О.Ю., Деменева В.В., Саженова Е.А., Толмачева Е.Н., Никитина Т.В., Васильев С.А. Сравнительный анализ аномалий метилома хориона при различных патологиях беременности // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2025. № 69. С. 93–102. doi: 10.17223/19988591/69/11

Comparative analysis of chorionic methylation abnormalities in various pregnancy pathologies

Andrew S. Zuev¹, Daniil G. Shevtsov², Oksana Yu. Vasilyeva³,
Victoria V. Demeneva⁴, Elena A. Sazhenova⁵, Ekaterina N. Tolmacheva⁶,
Tatiana V. Nikitina⁷, Stanislav A. Vasilyev⁸

^{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8} Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research
Medical Center, Tomsk, Russian Federation

^{2, 8} National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

¹ <https://orcid.org/0000-0001-9474-9335>, andrew.zuev@medgenetics.ru

Summary. The development of normal pregnancy at early stages is conditioned by epigenetic programs and is impossible without proper formation of the placenta and embryo. In the first trimester, epigenetic mechanisms are involved in these processes, one of which is DNA methylation. DNA methylation is involved in the regulation of various biological processes, such as cell differentiation and development, regulation of gene expression (as a rule, genes with reduced methylation levels in promoters are expressed), X-chromosome inactivation, genome imprinting, maintenance of chromosome stability, and others. Disruption of this process can lead to the formation of pathologic phenotypes such as spontaneous abortion (SA), pre-eclampsia (PE), and gestational diabetes mellitus (GDM). Currently, researchers have found many methylation abnormalities in these pathologies: for example, 54 differentially methylated regions (DMRs) associated with blood pressure, 1703 differentially methylated sites (DMSs) in early-onset pre-eclampsia, more than 200 DMRs in gestational diabetes mellitus, and 4 differentially expressed genes associated with spontaneous abortion have been identified in the trophoblast of chorionic villi. The emerging findings in such studies indicate that some epigenetic abnormalities and gene expression disorders may be involved in the development of gestational pathologies, affecting the cause of their formation - abnormal placentation. The methylation abnormalities observed in the considered pathologies of pregnancy may be particular cases of more general placental methylome disorders, the severity of phenotypic manifestation of which may vary from embryo death at early stages of development to term delivery. Given this and current theories of the pathogenesis of these diseases based on disorders of trophoblast development, it can be assumed that these pathologies may share common DNA methylation alterations. On the other hand, differences in the severity of clinical manifestations suggest the presence of unique methylation patterns, particularly in spontaneous abortion as an extreme manifestation of the phenotype. Detection of such abnormalities will have important diagnostic value for prognosis and preservation of pregnancy. In this study, we comparatively analysed differential DNA methylation data in chorionic villi from PE, GDM and SA. Methylation data in PE and GDM were obtained from the publicly available Genome Expression Omnibus (GEO) data repository - GSE200659, GSE100197, and GSE98224 datasets. Data for SA were obtained using reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) on spontaneous abortus material with normal karyotype ($n = 7$) compared to medical abortus ($n = 7$). Methylation data were analysed in R 4.3.0., using function packages in R (dplyr, data.table, tibble, tidyr, stringr, tibble) and function packages in UNIX (bedtools) and BMIQ and NOOB normalisation methods (function packages in R - ChAMP, minifi). Thus, 7 differentially methylated genes (DMGs) common to SA, PE and GDM were obtained: 3 hypomethylated genes - *WDR5*, *TMC4*, *MIR4533*; 3 hypermethylated genes - *ADARB2*, *INPPP5E*, *TUBB4A*; and 1 gene with different methylation differences in different parts of gene - *PRDM16*. There were 114

DMGs unique to SA: 32 hypomethylated and 81 hypermethylated genes. Enrichment analyses were performed using the DAVID v2024q2 database (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>). Common DMGs were found to be involved in pathways related to transmembrane transport processes, regulation of transcription and differentiation, RNA processing, cell adhesion, lipid metabolism and mitotic cycle regulation. DMGs unique to SA have been implicated in processes related to the regulation of transcription, translation, mitotic cycle, histogenesis, migration, cell proliferation and differentiation. Some of the unique DMGs, according to the mammalian phenotype database (<https://www.informatics.jax.org/batch>), were found to be associated with the embryo lethality phenotype - *LRRC8A*, *HDLBP*, *HIC1* and *ST14*, while others were involved in the process of placenta development - *BOK*, *BOK-AS1*.

The analysis showed that the pathologies under consideration have common and unique patterns of differential DNA methylation. We identified 7 common (3 hypomethylated, 3 hypermethylated and 1 with different methylation patterns) and 114 differentially methylated genes unique to SA (33 hypomethylated and 81 hypermethylated). However, the effects of methylation disruption of the identified genes remain unclear, and further studies at the transcriptional level in larger samples are needed.

The article contains 15 References.

Keywords: DNA methylation, chorionic villi, spontaneous abortion, preeclampsia, gestational diabetes mellitus, differentially methylated genes

Fundings: This work was partially supported by the grant of the Russian Science Foundation №23-15-00341.

For citation: Zuev AS, Shevtsov DG, Vasilyeva OYu, Demeneva VV, Sazhenova EA, Tolmacheva EN, Nikitina TV, Vasilyev SA. Comparative analysis of chorionic methylation abnormalities in different pregnancy pathologies. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2025;69:93-102. doi: 10.17223/19988591/69/11

Введение

Эпигенетические модификации генома играют ключевую роль на ранних этапах эмбриогенеза, регулируя процессы деления, дифференцировки, миграции, апоптоза и имплантации посредством изменения экспрессии определенных генов. Метилирование ДНК является ключевым механизмом, осуществляющим контроль этих процессов на ранних стадиях онтогенеза. Метилирование ДНК является динамическим процессом, изменяющимся в зависимости от дифференцировки клетки и продолжительности жизненного цикла, однако в некоторых случаях может иметь стабильный характер [1]. Нарушение этого процесса было показано при возникновении некоторых патологий беременности, таких как гестационный сахарный диабет (ГСД), преэклампсия (ПЭ) и спонтанный аборт (СА).

Хотя данные патологии давно описаны в медицинской литературе, понимание их патогенеза остается неполным, а диагностика основывается на уже клинически манифестированных фенотипах. Тем не менее современные исследования показывают, что патогенез рассматриваемых патологий основывается на нарушениях плацентации – патологии ангиогенеза и эндотелиальной дисфункции плацентарных сосудов с последующей неадекватной перфузией тканей, стрессом трофобласта и разнообразными клеточными реак-

циями [2–4]. Основываясь на данной теории и исследованиях метилома плацентарных тканей при гестационных патологиях, можно предположить, что аномалии метилирования ДНК могут быть связаны с патологической плацентацией.

В связи с этим целью данной работы является сравнительный анализ аномалий метилирования ДНК в ворсинах хориона при спонтанном аборте, преэклампсии и гестационном сахарном диабете и выявление общих и уникальных для спонтанного аборта дифференциально метилированных генов.

Материалы и методы

Данные о дифференциальном метилировании были получены из общедоступного хранилища данных Genome Expression Omnibus (GEO) – наборы данных GSE200659 для ГСД и GSE100197, GSE98224 для ПЭ. Опытные группы всех датасетов включали образцы ДНК плодных частей плацент, полученных от женщин без предшествующих патологий беременности и отобранных по специальным критериям в каждом случае. Контрольные группы включали образцы ДНК плодных частей плацент, полученных от женщин без патологии. Всего в анализ были включены данные о 73 опытных и 68 контрольных образцах для ПЭ и по 30 образцов опытной и контрольной группы для ГСД. Анализ профилей метилирования для GSE100197 и GSE98224 проводился с использованием метилочипов Illumina Human Methylation 450K BeadChip, для GSE200659 – с использованием метилочипов Illumina Infinium Human Methylation 850K BeadChip.

Для группы СА была выделена геномная ДНК из ворсин хориона спонтанных абортусов первого триместра беременности с нормальным кариотипом ($n = 7$). Для группы контроля была выделена геномная ДНК из ворсин хориона медицинских абортусов с нормальным кариотипом ($n = 7$). ДНК обеих групп была обработана бисульфитом натрия с использованием набора EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, USA). Анализ профилей метилирования ДНК проводился с помощью массового параллельного бисульфитного секвенирования ограниченного набора локусов (reduced representation bisulfite sequencing – RRBS).

Анализ данных метилирования проводился в R 4.3.0. Для анализа данных микрочипов (Illumina Infinium Human Methylation 850K BeadChip, Illumina Human Methylation 450K BeadChip) использовался пакет функций Chip Analysis Methylation Pipeline for Illumina (ChAMP). Дифференциально метилированные сайты (ДМС) были идентифицированы с использованием поправки на множественность сравнений ($FDR < 0,05$) и отличий уровня метилирования по сравнению с контрольной группой более 10%. Затем дифференциально метилированные сайты были трансформированы в дифференциально метилированные регионы (ДМР) длиной 1000 п.н. В качестве статистических методов для нормализации данных использовались методы BMIQ нормализации и NOOB нормализации (пакеты функций в R – ChAMP, minifi). Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакетов функций в R (dplyr, data.table, tibble, tidyr, stringr, tibble) и пакетов функций в UNIX (bedtools).

Анализ обогащения дифференциально метилированных генов проводился с использованием базы данных для аннотации, визуализации и комплексных открытий DAVID v2024q2 (<https://david.ncicrf.gov/home.jsp>). Анализ физических и функциональных белковых взаимодействий ДМГ проводился с использованием инструмента STRING version 12.0 (<https://string-db.org/>).

Результаты исследования и обсуждение

Были установлены профили метилирования в тканях ворсин хориона плацент I (в случае СА) и III (ПЭ, ГСД) триместров беременности. Плацента в норме характеризуется широкой вариабельностью профиля метилирования генома. Поэтому для дальнейшего анализа были взяты только CpG-сайты с вариабельностью менее 50% в контрольных группах из всех использованных датасетов. Были отобраны ДМС, которые имели одинаковое направление изменения метилирования во всех датасетах. Для каждого из полученных регионов в дальнейшем было определено его перекрывание с последовательностями генов с получением списков дифференциально метилированных генов. В результате было выявлено 7 общих ДМГ для всех исследованных патологий (3 гипометилированных – *WDR5*, *TMC4*, *MIR4533*; 3 гиперметилированных – *ADARB2*, *INPP5E*, *TUBB4A* и 1 с различным направлением метилирования в разных частях гена – *PRDM16*).

Общие ДМГ связаны с процессами трансмембранного транспорта, регуляции транскрипции и дифференцировки, процессинга РНК, адгезии клеток, липидного обмена и регуляции митотического цикла. Некоторые выявленные гены – *INPP5E*, *TUBB4A* и *WDR5* – оказались ассоциированы с работой цилиарного аппарата [5–7]. Развитие и функционирование ресничек необходимо для правильной миграции, адгезии, инвазии вневорсинчатого трофобласта в децидуальную ткань, а также регуляции клеточного цикла [8]. Вовлеченность генов в процессы, связанные с цилиопатиями, может обуславливать аномалии гистогенеза плацентарных тканей с дальнейшим формированием плацентарной недостаточности и патологических фенотипов. Помимо этого, *TUBB4A* и *WDR5* участвуют в регуляции экспрессии белков семейства FOX (forkhead box) – факторов транскрипции, участвующих в росте, пролиферации и дифференцировке клеток, в том числе во время эмбрионального развития.

Уникальные паттерны метилирования ДНК были определены для СА. Специфические, свойственные только группе СА ДМГ были отобраны на основании различного направления изменений метилирования ДНК в сравнении с ПЭ и ГСД. Было выявлено 32 гипометилированных и 81 гиперметилированный ДМГ.

Уникальные ДМГ при СА были вовлечены в разнообразные процессы, среди которых большая часть оказалась задействована в регуляции транскрипции, трансляции, митотического цикла, гистогенеза, миграции, пролиферации и дифференцировки клеток. Некоторые из них, согласно базе дан-

ных mammalian phenotype (<https://www.informatics.jax.org/batch>), были непосредственно ассоциированы с фенотипом эмбриолетальности (*LRRC8A*, *HDLBP*, *HIC1* и *ST14*), в то время как другие были вовлечены в процесс развития плаценты (*BOK*, *BOK-AS1*). Анализ белковых взаимодействий показал функциональную кластеризацию для 40 уникальных ДМГ.

В недавних исследованиях было показано, что aberrантное метилирование ДНК в ворсинах хориона встречается при различных патологиях периода беременности – СА, ПЭ, ГСД. Было выявлено 54 дифференциально метилированных регионов, связанных с изменениями артериального давления [9]. Wilson et al. сообщали об идентификации 1 703 дифференциально метилированных сайтов при ПЭ с ранним началом [10]. При ГСД обнаружили более 200 ДМС, определив для них 17 генов [11]. 4 дифференциально экспрессируемых гена были ассоциированы с СА [12]. При этом аномалии метилома могут встречаться в разнообразных по функциям генах – супрессорах и активаторах опухолей, генах сигнальных путей, регуляторов метаболизма, ангио- и органогенеза, микроРНК и др. [3]. Таким образом, аномалии метилирования ДНК могут быть связаны с формированием специфических фенотипов патологий периода беременности [13–15].

В этой работе мы сравнили профили метилирования в ворсинах хориона при СА с патологиями периода беременности – ПЭ и ГСД. Анализ показал, что рассматриваемые патологии имеют как общие, так и специфические гипо- и гиперметилированные гены. Однако остаются неясными эффекты нарушения метилирования выявленных генов, в связи с чем необходимы дальнейшие исследования с более крупными и хорошо охарактеризованными выборками для лучшего понимания связи эпигенетических модификаций плацентарных тканей и патологий беременности.

Заключение

Сравнительный анализ данных метилирования ДНК в ворсинах хориона при различных гестационных патологиях выявил 7 общих дифференциально метилированных генов для рассматриваемых патологий беременности и 114 уникальных дифференциально метилированных генов для СА. Большая часть выявленных генов вовлечена в процессы регуляции транскрипции, трансляции, митотического цикла, гистогенеза, миграции, пролиферации и дифференцировки клеток, необходимые для развития трофобласта. Часть обнаруженных уникальных ДМГ была связана с летальным фенотипом – *LRRC8A*, *HDLBP*, *HIC1* и *ST14*.

Список источников

1. Mattei A.L., Bailly N., Meissner A. DNA methylation: a historical perspective // Trends in genetics. 2022. Vol. 38, № 7. PP. 676–707. doi: 10.1016/j.tig.2022.03.010
2. Rana S., Lemoine E., Granger J.P., Karumanchi S.A. Preeclampsia: Pathophysiology, Challenges, and Perspectives // Circulation research. 2019. Vol. 126, № 1. PP. 1094–1112. doi: 10.1161/RES.0000000000000315
3. Deng F., Lei J., Qiu J., Zhao C., Wang X., Li M., Sun M., Zhang M., Gao Q. DNA methylation landscape in pregnancy-induced hypertension: progress and challenges // Reproductive biology and endocrinology: RB&E. 2024. Vol. 22. 77. doi: 10.1186/s12958-024-01248-0

4. Траль Т.Г., Толибова Г.Х., Мусина Е.В., Ярмолинская М.И. Молекулярно-морфологические особенности формирования хронической плацентарной недостаточности, обусловленной разными типами сахарного диабета // Сахарный диабет. 2020. Вып. 23, № 2. С. 185–191. doi: 10.14341/DM10228
5. Bielas S.L., Silhavy J.L., Brancati F., Kisseleva M.V., Al-Gazali L., Sztriha L., Bayoumi R.A., Zaki M.S., Abdel-Aleem A., Rosti R.O., Kayserili H., Swistun D., Scott L.C., Bertini E., Boltshauser E., Fazzi E., Travaglini L., Field S.J., Gayral S., Jacoby M., Schurmans S., Dallapiccola B., Majerus P.W., Valente E.M., Gleeson J.G. Mutations in INPP5E, encoding inositol polyphosphate-5-phosphatase E, link phosphatidyl inositol signaling to the ciliopathies // *Nature Genetics*. 2009/ Vol. 41. PP. 1032–1036. doi: 10.1038/ng.423
6. Ritter A., Roth S., Kreis N.N., Friemel A., Hooek S.C., Steglich Souto A., Eichbaum C., Neuhoﬀ A., Chen Q., Solbach C., Louwen F., Yuan J. Primary Cilia in Trophoblastic Cells: Potential Involvement in Preeclampsia // *Hypertension*. 2020. Vol. 76, № 5. PP. 1491–1505. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15433
7. Kulkarni S.S., Griﬃn J.N., Date P.P., Liem K.F., Jr, Khokha M.K. WDR5 Stabilizes Actin Architecture to Promote Multiciliated Cell Formation // *Developmental cell*. 2018. Vol. 46, № 5. PP. 595–610.e3. doi: 10.1016/j.devcel.2018.08.009
8. Nishimura Y., Kasahara K., Shiromizu T., Watanabe M., Inagaki M. Primary Cilia as Signaling Hubs in Health and Disease // *Advanced science* (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany). 2018. Vol. 6 (1). 1801138. 16. doi: 10.1002/advs.201801138
9. Broséus L., Vaiman D., Tost J., Martin C.R.S., Jacobi M., Schwartz J.D., Béranger R., Slama R., Heude B., Lepeule J. Maternal blood pressure associates with placental DNA methylation both directly and through alterations in cell-type composition // *BMC Medicine*. 2022. Vol. 20. 397. doi: 10.1186/s12916-022-02610-y
10. Wilson S.L., Leavey K., Cox B.J., Robinson W.P. Mining DNA methylation alterations towards a classification of placental pathologies // *Human molecular genetics*. 2018. Vol. 27, № 1. PP. 135–146. doi: 10.1093/hmg/ddx391
11. Wang W.J., Huang R., Zheng T., Du Q., Yang M.N., Xu Y.J., Liu X., Tao M.Y., He H., Fang F., Li F., Fan J.G., Zhang J., Briollais L., Ouyang F., Luo Z.C. Genome-Wide Placental Gene Methylations in Gestational Diabetes Mellitus, Fetal Growth and Metabolic Health Biomarkers in Cord Blood // *Frontiers in endocrinology* (Lausanne). 2022. Vol. 13. 875180. doi: 10.3389/fendo.2022.875180
12. Qin M., Chen W., Hua L., Meng Y., Wang J., Li H., Yang R., Yan L., Qiao J. DNA methylation abnormalities induced by advanced maternal age in villi prime a high-risk state for spontaneous abortion // *Clinical epigenetics*. 2023. Vol. 15. 44. doi: 10.1186/s13148-023-01432-w
13. Binder A.M., LaRocca J., Lesseur C., Marsit C.J., Michels K.B. Epigenome-wide and transcriptome-wide analyses reveal gestational diabetes is associated with alterations in the human leukocyte antigen complex // *Clinical epigenetics*. 2015. Vol. 7, № 1. 79. doi: 10.1186/s13148-015-0116-y
14. Yang M.N., Huang R., Zheng T., Dong Y., Wang W.J., Xu Y.J., Mehra V., Zhou G.D., Liu X., He H., Fang F., Li F., Fan J.G., Zhang J., Ouyang F., Briollais L., Li J., Luo Z.C., Shanghai Birth Cohort. Genome-wide placental DNA methylations in fetal overgrowth and associations with leptin, adiponectin and fetal growth factors // *Clinical epigenetics*. 2022. Vol. 14, № 1. 192. doi: 10.1186/s13148-022-01412-6
15. Matsumoto Y., Shinjo K., Mase S., Fukuyo M., Aoki K., Ozawa F., Yoshihara H., Goto S., Kitaori T., Ozaki Y., Takahashi S., Kaneda A., Sugiura-Ogasawara M., Kondo Y. Characteristic DNA methylation profiles of chorionic villi in recurrent miscarriage // *Scientific reports*. 2022. Vol. 12, № 1. 11673. doi: 10.1038/s41598-022-15656-y

References

1. Mattei AL, Bailly N, Meissner A. DNA methylation: a historical perspective. *Trends Genet*. 2022;38:676-707. doi: 10.1016/j.tig.2022.03.010

2. Rana S, Lemoine E, Granger JP, Karumanchi SA. Preeclampsia: Pathophysiology, Challenges, and Perspectives. *Circ Res*. 2019;124:1094-1112. doi: 10.1161/RES.0000000000000315
3. Deng F, Lei J, Qiu J, Zhao C, Wang X, Li M, Sun M, Zhang M, Gao Q. DNA methylation landscape in pregnancy-induced hypertension: progress and challenges. *Reprod. Biol. Endocrinol*. 2024;22:77. doi: 10.1186/s12958-024-01248-0
4. Tral TG, Tolibova GK, Musina EV, Yarmolinskaya MI. Molecular and morphological peculiarities of chronic placental insufficiency formation caused by different types of diabetes mellitus. *Diabetes mellitus*. 2020;23(2):185-191. doi: 10.14341/DM10228
5. Bielas SL, Silhavy JL, Brancati F, Kisseleva MV, Al-Gazali L, Sztrihai L, Bayoumi RA, Zaki MS, Abdel-Aleem A, Rosti RO, Kayserili H, Swistun D, Scott LC, Bertini E, Boltshauser E, Fazzi E, Travaglini L, Field SJ, Gayral S, Jacoby M, Schurmans S, Dallapiccola B, Majerus PW, Valente EM, Gleeson JG. Mutations in INPP5E, encoding inositol polyphosphate-5-phosphatase E, link phosphatidyl inositol signaling to the ciliopathies. *Nat Genet*. 2009;41:1032-6. doi: 10.1038/ng.423
6. Ritter A, Roth S, Kreis NN, Friemel A, Hooch SC, Steglich Souto A, Eichbaum C, Neuhoof A, Chen Q, Solbach C, Louwen F, Yuan J. Primary cilia in trophoblastic cells: potential involvement in preeclampsia. *Hypertension*. 2020;76:1491-1505. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15433
7. Kulkarni SS, Griffin JN, Date PP, Liem KF Jr, Khokha MK. WDR5 stabilizes actin architecture to promote multiciliated cell formation. *Dev Cell*. 2018;46:595-610.e3. doi: 10.1016/j.devcel.2018.08.009
8. Nishimura Y, Kasahara K, Shiromizu T, Watanabe M, Inagaki M. Primary Cilia as Signaling Hubs in Health and Disease. *Adv Sci (Weinh)*. 2018;6(1):1801138. doi: 10.1002/advs.201801138
9. Broséus L, Vaiman D, Tost J, Martin CRS, Jacobi M, Schwartz JD, Béranger R, Slama R, Heude B, Lepeule J. Maternal blood pressure associates with placental DNA methylation both directly and through alterations in cell-type composition. *BMC Med*. 2022;20:397. doi: 10.1186/s12916-022-02610-y
10. Wilson SL, Leavey K, Cox BJ, Robinson WP. Mining DNA methylation alterations towards a classification of placental pathologies. *Hum Mol Genet*. 2018;27(1):135-146. doi: 10.1093/hmg/ddx391
11. Wang WJ, Huang R, Zheng T, Du Q, Yang MN, Xu YJ, Liu X, Tao MY, He H, Fang F, Li F, Fan JG, Zhang J, Briollais L, Ouyang F, Luo ZC. Genome-Wide Placental Gene Methylations in Gestational Diabetes Mellitus, Fetal Growth and Metabolic Health Biomarkers in Cord Blood. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:875180. doi: 10.3389/fendo.2022.875180
12. Qin M, Chen W, Hua L, Meng Y, Wang J, Li H, Yang R, Yan L, Qiao J. DNA methylation abnormalities induced by advanced maternal age in villi prime a high-risk state for spontaneous abortion. *Clin Epigenetics*. 2023;15(1):44. doi: 10.1186/s13148-023-01432-w
13. Binder AM, LaRocca J, Lesseur C, Marsit CJ, Michels KB. Epigenome-wide and transcriptome-wide analyses reveal gestational diabetes is associated with alterations in the human leukocyte antigen complex. *Clin Epigenetics*. 2015;7(1):79. doi: 10.1186/s13148-015-0116-y
14. Yang MN, Huang R, Zheng T, Dong Y, Wang WJ, Xu YJ, Mehra V, Zhou GD, Liu X, He H, Fang F, Li F, Fan JG, Zhang J, Ouyang F, Briollais L, Li J, Luo ZC; Shanghai Birth Cohort. Genome-wide placental DNA methylations in fetal overgrowth and associations with leptin, adiponectin and fetal growth factors. *Clin Epigenetics*. 2022;14(1):192. doi: 10.1186/s13148-022-01412-6
15. Matsumoto Y, Shinjo K, Mase S, Fukuyo M, Aoki K, Ozawa F, Yoshihara H, Goto S, Kitaori T, Ozaki Y, Takahashi S, Kaneda A, Sugiura-Ogasawara M, Kondo Y. Characteristic DNA methylation profiles of chorionic villi in recurrent miscarriage. *Sci Rep*. 2022;12(1):11673. doi: 10.1038/s41598-022-15656-y

Информация об авторах:

Зуев Андрей Сергеевич, м.н.с. лаборатории инструментальной геномики НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН (Томск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9474-9335>

E-mail: andrew.zuev@medgenetics.ru

Шевцов Даниил Геннадьевич, лаборант-исследователь лаборатории инструментальной геномики НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН (Томск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9817-7669>

E-mail: daniil.shevtsov@medgenetics.ru

Васильева Оксана Юрьевна, м.н.с. лаборатории инструментальной геномики НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН (Томск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5797-0014>

E-mail: oksana.vasilyeva@medgenetics.ru

Деменева Виктория Вадимовна, м.н.с. лаборатории инструментальной геномики НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН (Томск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5315-4914>

E-mail: vika.demeneva@medgenetics.ru

Саженова Елена Александровна, канд. биол. наук, н.с. лаборатории инструментальной геномики НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН (Томск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3875-3932>

E-mail: elena.sazhenova@medgenetics.ru

Толмачева Екатерина Николаевна, канд. биол. наук, н.с. лаборатории инструментальной геномики НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН (Томск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6427-3276>

E-mail: kate.tolmacheva@medgenetics.ru

Никитина Татьяна Владимировна, канд. биол. наук, н.с. лаборатории инструментальной геномики НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН (Томск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4230-6855>

E-mail: t.nikitina@medgenetics.ru

Васильев Станислав Анатольевич, д-р биол. наук, рук. лаборатории инструментальной геномики НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН (Томск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5301-070X>

E-mail: stanislav.vasilyev@medgenetics.ru

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Information about the authors:

Andrew S. Zuev, Junior Researcher of the Laboratory of Instrumental Genomics, Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9474-9335>

E-mail: andrew.zuev@medgenetics.ru

Daniil G. Shevtsov, Research Laboratory Assistant of the Laboratory of Instrumental Genomics, Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9817-7669>

E-mail: daniil.shevtsov@medgenetics.ru

Oksana Yu. Vasilyeva, Junior Researcher of the Laboratory of Instrumental Genomics, Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5797-0014>

E-mail: oksana.vasilyeva@medgenetics.ru

Victoria V. Demeneva, Junior Researcher of the Laboratory of Instrumental Genomics, Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5315-4914>

E-mail: vika.demeneva@medgenetics.ru

Elena A. Sazhenova, Cand. Sci. (Biol.) of the Laboratory of Instrumental Genomics, Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3875-3932>

E-mail: elena.sazhenova@medgenetics.ru

Ekaterina N. Tolmacheva, Cand. Sci. (Biol.) of the Laboratory of Instrumental Genomics, Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6427-3276>

E-mail: kate.tolmacheva@medgenetics.ru

Tatiana V. Nikitina, Cand. Sci. (Biol.) of the Laboratory of Instrumental Genomics, Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4230-6855>

E-mail: t.nikitina@medgenetics.ru

Stanislav A. Vasilyev, Dr. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Instrumental Genomics, Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5301-070X>

E-mail: stanislav.vasilyev@medgenetics.ru

The Authors declare no conflict of interest.

*Статья поступила в редакцию 10.10.2024;
одобрена после рецензирования 25.10.2024; принята к публикации 03.03.2025.*

*The article was submitted 10.10.2024;
approved after reviewing 25.10.2024; accepted for publication 03.03.2025.*

Научная статья

УДК 57.085.23

doi: 10.17223/19988591/69/12

Моделирование нейродегенеративных заболеваний, вызванных протеинопатиями, на культурах клеток человека

Анастасия Александровна Малахова¹, Элина Равильевна Аллаярова²,
Динара Витальевна Шарипова³, Софья Викторовна Павлова⁴,
Елена Викторовна Григорьева⁵, Сергей Петрович Медведев⁶,
Сурен Минасович Закиян⁷

^{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7} Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, Россия

^{2, 3} Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия

^{1, 4, 5, 6, 7} Институт химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

¹ <https://orcid.org/0000-0003-1916-1333>, amal@bionet.nsc.ru

² e.allayarova@gsu.nsu.ru

³ d.sharipova@gsu.nsu.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0003-1095-3692>, spav@bionet.nsc.ru

⁵ <https://orcid.org/0000-0002-9162-9108>, evlena@bionet.nsc.ru

⁶ <https://orcid.org/0000-0002-1520-5549>, medvedev@bionet.nsc.ru

⁷ <https://orcid.org/0000-0003-2448-6511>, zakian@bionet.nsc.ru

Аннотация. Причиной развития большинства нейродегенеративных заболеваний являются протеинопатии, связанные с накоплением в нейронах агрегатов неправильно свернутых белков синуклеина при болезни Паркинсона, амилоида при болезни Альцгеймера, хантингтина при болезни Гентингтона и др., что приводит к нарушению функционирования лизосомального аппарата, дисфункции митохондрий и в конечном итоге к клеточной гибели. Для изучения патологических процессов, приводящих к гибели нейронов, нами созданы клеточные модели на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) с доксициклин-управляемой экспрессией альфа-синуклеина (SNCA), содержащего эпитопы 3×FLAG и 2×Strep-Tag II, необходимые для аффинной очистки белковых комплексов, взаимодействующих с альфа-синуклеином. Трансгены, кодирующие химерный белок SNCA-C-3XFLAG-2XST и трансаактиватор M2rtTA, внесены в локус *AAVS1* ИПСК пациента с болезнью Паркинсона с помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9. Подтвержден плюрипотентный статус полученных трансгенных клонов ИПСК и проведена направленная дифференцировка в нейроны. Экспрессия SNCA-C-3XFLAG-2XST в нейронах, дифференцированных из ИПСК, подтверждена Вестерн-блот-анализом. Полученные клеточные модели обладают способностью к неограниченной пролиферации в культуре, что позволяет планировать эксперименты по изучению взаимодействий альфа-синуклеина с различными белками и структурами в клетках человека при синуклеинопатиях, а также проводить тестирование потенциальных лекарственных препаратов на любых типах клеток организма человека, которые можно получить в результате направленной дифференцировки ИПСК.

Ключевые слова: клеточные модели на основе ИПСК, протеинопатия, альфа-синуклеин, нейродегенеративные заболевания, CRISPR/Cas9

Источник финансирования: работа выполнена при поддержке Фонда научно-технологического развития Югры в соответствии с проектом № 2023-573-05/2023.

Благодарности: в работе использовали оборудование Центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН (<https://ckp.icgen.ru/ckpmabo/>, поддержан бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН FWNR-2022-0015), а также ЦКП «Геномика» СО РАН (<http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/corefacility>).

Для цитирования: Малахова А.А., Аллаярова Э.Р., Шарипова Д.В., Павлова С.В., Григорьева Е.В., Медведев С.П., Закиан С.М. Моделирование нейродегенеративных заболеваний, вызванных протеинопатией, на культурах клеток человека // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2025. № 69. С. 103–112. doi: 10.17223/19988591/69/12

Original article

doi: 10.17223/19988591/69/12

In vitro models of proteinopathy-associated neurodegenerative diseases

Anastasia A. Malakhova¹, Elina R. Allayarova², Dinara V. Sharipova³,
Sophia V. Pavlova⁴, Elena V. Grigor'eva⁵, Sergey P. Medvedev⁶,
Suren M. Zakian⁷

^{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7} *Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the RAS,
Novosibirsk, Russia*

^{2, 3} *Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

^{1, 4, 5, 6, 7} *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch
of the RAS, Novosibirsk, Russia*

¹ <https://orcid.org/0000-0003-1916-1333>, amal@bionet.nsc.ru

² e.allayarova@gsu.nsu.ru

³ d.sharipova@gsu.nsu.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0003-1095-3692>, spav@bionet.nsc.ru

⁵ <https://orcid.org/0000-0002-9162-9108>, evlana@bionet.nsc.ru

⁶ <https://orcid.org/0000-0002-1520-5549>, medvedev@bionet.nsc.ru

⁷ <https://orcid.org/0000-0003-2448-6511>, zakian@bionet.nsc.ru

Summary. Most neurodegenerative diseases are caused by proteinopathies associated with accumulation of misfolded protein aggregates in neurons - synuclein in Parkinson's, amyloid in Alzheimer's, huntingtin in Huntington's, etc. This leads to lysosomal dysfunction, mitochondrial dysfunction and ultimately cell death. To study the pathological processes leading to neuronal death, we have generated cell models with doxycycline-controlled expression of alpha-synuclein (SNCA) containing 3×FLAG and 2×Strep-Tag II epitopes necessary for affine purification of protein complexes interacting with alpha-synuclein. The induced pluripotent stem cell (iPSC) line from a patient with Parkinson's disease m10.7 was chosen as the starting line to create a cell model of the synucleopathy. This line is registered in the hPSCreg human pluripotent stem cell registry as ICGi041-A. Transgenes encoding the chimeric protein SNCA-C-3XFLAG-2XST and the transactivator M2rtTA were introduced into the *AAVS1* locus of the m10.7 iPSCs line using the CRISPR/Cas9 genome editing system. The pluripotent status of the resulting transgenic iPSC clones was confirmed and directed differentiation into neurons was performed (See Fig. 1a-b). The expression of SNCA-C-3XFLAG-2XST in neurons differentiated from iPSCs was demonstrated by Western

blot analysis (See Fig. 1c). The cell models obtained have the ability to proliferate indefinitely in culture. This makes it possible to design experiments to study the interactions of alpha-synuclein with different proteins and structures in human cells with synucleinopathies, as well as to test potential drugs on any type of human body cell that can be obtained as a result of directed differentiation of iPSCs.

The article contains 1 Figure, 12 References.

Keywords: iPSC-based cell models, proteinopathy, alpha-synuclein, neurodegenerative diseases, CRISPR/Cas9

Fundings: This research was funded by Fund for Scientific and Technological Development of Ugra, according to project number 2023-573-05/2023.

Acknowledgments: The immunofluorescent imaging was performed using resources of the Common Facilities Center of Microscopic Analysis of Biological Objects, ICG SB RAS (<https://ckp.icgen.ru/ckpmabo/>), supported by the state project of the Institute of Cytology and Genetics (FWNR-2022-0015). Sanger sequencing was performed at the SB RAS Genomics Core Facility (<http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/corefacility>).

For citation: Malakhova AA, Allayarova ER, Sharipova DV, Pavlova SV, Grigor'eva EV, Medvedev SP, Zakian SM. In vitro models of proteinopathy-associated neurodegenerative diseases. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2025;69:103-112. doi: 10.17223/19988591/69/12

Введение

Протеинопатии – это заболевания, при которых наблюдается изменение конформации определенного белка, приобретение им токсической активности и потеря нормальной функции. К протеинопатиям относится большое число болезней, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь диффузных телец Леви, прионные заболевания, таупатии, боковой амиотрофический склероз, лобно-височная дегенерация, а также такие редкие заболевания, как британская и датская деменции [1]. Болезнь Паркинсона является одним из самых распространенных нейродегенеративных заболеваний, которое связано с гибелью нейронов черной субстанции головного мозга, продуцирующих нейромедиатор дофамин. Недостаточность дофамина вызывает целый набор тяжелых симптомов, среди которых брадикинезия, ригидность мышц и тремор [2]. Для болезни Паркинсона характерна клиническая и генетическая гетерогенность, что приводит к большим трудностям при разработке новых лекарственных препаратов против данного заболевания. Клеточные модели на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) являются незаменимым инструментом биомедицинских исследований. ИПСК обладают способностью к неограниченной пролиферации в культуре, что позволяет планировать масштабные эксперименты по изучению механизмов развития заболеваний и тестирование потенциальных лекарственных препаратов на любых типах клеток организма человека, которые можно получить в результате направленной дифференцировки. Моделирование нейродегенеративных заболеваний *in vitro* имеет особенно важное значение в связи с ограниченной доступностью био-

материала для исследований, а также отсутствием методов терапии, позволяющих исключить причины развития патологических процессов, приводящих к гибели нейронов.

Генетические и патофизиологические исследования пациентов с болезнью Паркинсона, деменцией с тельцами Леви, множественной системной атрофией демонстрируют вовлеченность альфа-синуклеина (SNCA) в развитие целого ряда патологий, объединяемых в группу синуклеинопатий [3]. На терминальных стадиях развития данных болезней SNCA входит в состав так называемых телец Леви – многокомпонентных белковых агрегатов, однако до сих пор доподлинно неизвестен конкретный механизм патологического действия данного белка на жизнеспособность нейронов головного мозга. Для обеспечения прогресса в данном направлении необходима разработка экспериментальных систем, которые предназначены для выяснения паттерна взаимодействия SNCA с различными белками и структурами в нейронах человека. Для изучения состава белковых комплексов в культурах клеток было предложено использовать tandemную очистку аффинными смолами, связывающими якорные пептиды 3×FLAG и 2×Strep-Tag II целевого белка [4]. Целью данной работы является создание клеточной модели на основе ИПСК с доксициклин-управляемой экспрессией SNCA с эпитопами 3×FLAG и 2×Strep-Tag II, позволяющей проводить изучение межмолекулярных взаимодействий SNCA и механизмов развития нейродегенерации при синуклеинопатии.

Материалы и методы

Линия ИПСК m10.7 (зарегистрирована в международном реестре плюрипотентных стволовых клеток человека hPSCreg под именем ICGi041-A, <https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi041-A>, дата последнего доступа 31.07.2024) была получена из мононуклеарных клеток крови пациента с болезнью Паркинсона и охарактеризована на наличие признаков плюрипотентности методами иммуофлуоресцентного окрашивания и количественной ПЦР, как описано ранее [5]. Трансген SNCA с эпитопами 3×FLAG и 2×Strep-Tag II под управлением доксициклин-зависимого промотора, а также трансген трансактиватора M2rtTA были внесены в locus *AAVS1* линии ИПСК m10.7 с помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9 [6]. В качестве донорной последовательности для внесения трансгена SNCA в locus *AAVS1* использовали плазмиду pSNCA-C-3XFLAG-2XST-donor, конструкция которой защищена патентом [7]. Полученные трансгенные клоны ИПСК были проверены на наличие целевых и нецелевых встроок в геном с помощью ПЦР-скрининга [6]. Анализ экспрессии трансгена SNCA-C-3XFLAG-2XST проверяли с помощью количественной ПЦР с праймерами, подобранными на последовательности, кодирующие 3×FLAG и 2×Strep-Tag II (CGAAGCCCAACCTTTCATAGA/CCCACCCTCAGTTTGAGAAG). Проведена направленная дифференцировка полученных трансгенных линий ИПСК в дофаминергические нейроны по протоколу, описанному Oosterveen et al. [8]. Наличие белкового продукта трансгена SNCA-C-3XFLAG-

2XST в нейронах, дифференцированных из ИПСК, подтвердили с помощью Вестерн-блот-анализа. Для приготовления тотальных белковых экстрактов клетки лизировали в холодном буфере RIPA (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% NP-40) с добавлением ингибиторов фосфатаз и протеаз (Thermo Fisher Scientific) в расчете 24 мкл RIPA буфера на 100 тыс. клеток. Лизировали в течение 30 мин на шейкере при +4°C. Затем образцы центрифугировали при 14000g 15 мин, супернатант фасовали по 24 мкл на льду, образцы хранили при –70°C. Нормализованные по количеству белка тотальные экстракты смешивали с равным объемом буфера Лэммли (2% SDS, 20% глицерол, 10% 2-меркаптоэтанол, 0,004% бромфеноловый синий, 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8), перемешивали, инкубировали в течение 5 мин при температуре 95°C и наносили на гель в количестве 20–40 мкг на дорожку. Электрофоретическое разделение белков проводили в 15%-ном полиакриламидном геле в буфере, содержащем 2,5 mM Tris, 1,92 mM глицин, 0,01% SDS. После разделения белки переносили на мембрану Immun-Blot PVDF Membrane For Protein Blotting (Bio-Rad) при постоянном токе 150 мА в течение 0,5 ч в буфере для переноса (2,5 mM Tris, 19,2 mM глицин, 20% метанол). Мембрану фиксировали в 0,4%-ном параформальдегиде в течение 30 мин, затем помещали в блокирующий раствор (фосфатно-солевой буфер PBS, 0,1% Triton X-100, 2% сухое молоко) на 1 ч при комнатной температуре. Далее инкубировали с первичными антителами в течение 14–16 часов при +4°C. Мембрану трижды отмывали в растворе PBST (фосфатно-солевой буфер PBS, 0,1% Triton X-100) по 5 мин, а затем инкубировали со вторичными антителами в течение 2 ч при комнатной температуре. По истечении времени трижды отмывали мембрану в растворе PBST. Детекцию осуществляли с использованием набора для хемилюминесцентной детекции ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad).

Результаты исследования и обсуждение

В настоящее время не существует надежной модели, подходящей для изучения механизмов развития нейродегенеративных заболеваний, несмотря на активные исследования в этой области [9]. ИПСК человека обладают рядом преимуществ для изучения многих аспектов нейродегенерации благодаря их свойству плюрипотентности, способности к самообновлению и дифференцировке в различные типы клеток организма человека. В ходе работы нами получена и охарактеризована линия m10.7 ИПСК пациента с болезнью Паркинсона. Клетки линии m10.7 экспрессируют маркеры плюрипотентности OCT3/4, NANOG, SOX2, TRA-1-60 (рис. 1, а), а также способны давать производные трех зародышевых листков при спонтанной дифференцировке (рис. 1, б). Линия ИПСК m10.7 зарегистрирована в международном реестре плюрипотентных стволовых клеток человека hPSCreg под именем ICGi041-A (<https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi041-A>, дата последнего доступа 31.07.2024).

В клетки полученной плюрипотентной линии m10.7 с помощью системы CRISPR/Cas9 внесен доксициклин-управляемый трансген альфа-синукле-

ина SNCA с эпитопами 3×FLAG и 2×Strep-Tag II, а также трансген транскриптора M2rtTA, необходимого для управления экспрессией в системе TET-ON. Трансген химерного белка SNCA-C-3XFLAG-2XST интегрировали в локус *AAVS1* ИПСК пациента с болезнью Паркинсона путем гомологичной рекомбинации с помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9 [10]. Локус *AAVS1*, расположенный на хромосоме 19 человека, относится к локусам, имеющим условное название «safe harbor». Расположение трансгена в этом локусе обеспечивает его стабильную экспрессию (без влияния на неё эпигенетических модификаций) и не нарушает экспрессию других генов [11]. Отобрано 8 субклонов ИПСК, несущих указанные трансгены в локусе *AAVS1*. Экспрессия трансгена SNCA-C-3XFLAG-2XST в субклонах запускалась при добавлении в культуральную среду 2 мкг/мл доксициклина, что подтверждено количественной ПЦР с обратной транскрипцией. Субклоны Sc1, Sc2, Sc9, Sc10 были направленно дифференцированы в дофаминергические нейроны. Экспрессия SNCA и химерного белка SNCA-C-3XFLAG-2XST в нейронах подтверждена с помощью Вестерн-блот-анализа (рис. 1, c).

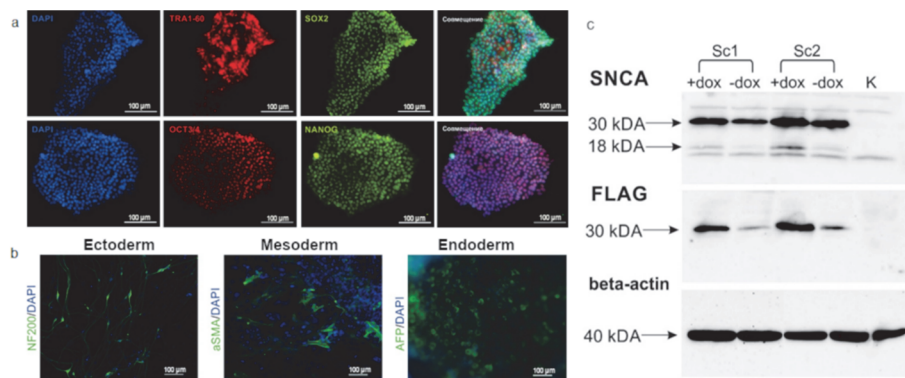


Рис. 1. Подтверждение плюрипотентного статуса линии ИПСК m10.7 с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания: *a* – экспрессия маркеров плюрипотентности SOX2, TRA-1-60, OCT3/4, NANOG, *b* – экспрессия маркеров производных трех зародышевых листков, полученных при спонтанной дифференцировке: NF200 (эктодерма), aSMA (мезодерма), AFP (энтодерма). Ядра окрашены DAPI. *c* – Вестерн-блот-анализ экспрессии альфа-синуклеина в нейронах, дифференцированных из субклонов (Sc1, Sc2, культивируемых в присутствии (+dox) или отсутствии (–dox) доксициклина) линии ИПСК m10.7, несущих доксициклин-управляемый трансген SNCA-C-3XFLAG-2XST в локусе *AAVS1*, с помощью антител против альфа-синуклеина (SNCA) и 3×FLAG-эпитопа (FLAG). В качестве референса использовали бета-актин (beta-actin). В качестве негативного контроля (K) использовались белковые экстракты из линии ИПСК здорового человека iMA-1L

[Fig. 1. Confirmation of the pluripotent status of the iPSC m10.7 line by immunofluorescence staining: *a* - Expression of pluripotency markers SOX2, TRA-1-60, OCT3/4, NANOG, *b* - expression of markers of derivatives of three germ layers obtained during spontaneous differentiation: NF200 (ectoderm), aSMA (mesoderm), AFP (endoderm). Nuclei are stained with DAPI. *c* - Western blot analysis of alpha-synuclein expression in neurons differentiated from subclones Sc1, Sc2 of the m10.7 iPSC line carrying the doxycycline-controlled transgene SNCA-C-3XFLAG-2XST at the *AAVS1* locus. Antibodies against alpha-synuclein (SNCA) and 3×FLAG epitope (FLAG) were used in the analysis, beta-actin was used as a reference. Protein extracts from the iMA-1L iPSC line of healthy human were used as a negative control (K)]

Антитела на альфа-синуклеин детектировали сигналы, соответствующие белкам с молекулярной массой 18 и 30 кДа. Молекулярная масса нативного белка альфа-синуклеина – 14,5 кДа, а суммарная молекулярная масса эпитопов 3×FLAG и 2×Strep tag II – около 3,5 кДа. Сигналы, соответствующие белкам молекулярной массы 18 кДа, довольно ярко детектируются в образцах клеток, культивировавшихся в присутствии доксициклина (Dox+), и соответствуют продукту, синтезированному с внесенного в геном клеток трансгена SNCA-C-3XFLAG-2XST. Наиболее яркие сигналы в районе 30 кДа, вероятно, соответствуют димерной форме альфа-синуклеина, которая может существовать в клетке в равновесии с мономерной формой [12]. Интересно, что белковые продукты молекулярной массой 30 кДа также обнаружены при использовании антител на 3×FLAG-эпитоп, что подтверждает способность химерного белка участвовать в димеризации. Наличие слабых сигналов, выявляемых антителами на 3×FLAG-эпитоп в образцах Dox–, свидетельствует о наличии базовой экспрессии трансгенов с индуцируемым промотором, что подтверждено как Вестерн-блот-анализом, так и количественной ПЦР. С помощью созданной уникальной системы можно детально исследовать межмолекулярные взаимодействия альфа-синуклеина, что позволит получить новые данные о молекулярно-генетических механизмах развития болезни Паркинсона и других синуклеинопатий, а также найти новые мишени для потенциальных лекарственных препаратов.

Заключение

В настоящей работе была создана уникальная клеточная модель протеинопатии, предназначенная для исследования межмолекулярных взаимодействий альфа-синуклеина, основанная на пациент-специфичных ИПСК. В полученных клеточных линиях происходит индукция экспрессии альфа-синуклеина, меченного 3×FLAG и 2×Strep-Tag II эпитопами. Наличие этих эпитопов не нарушает процессы димеризации альфа-синуклеина, а после манипуляций с геномным редактированием ИПСК сохраняют свой плюрипотентный статус. Полученная клеточная модель позволяет изучать механизмы влияния протеинопатии на жизнедеятельность нейронов, а также проводить скрининг и тестирование потенциальных лекарственных препаратов на релевантных типах клеток, полученных в результате дифференцировки ИПСК.

Список источников

1. Hartl F.U. Protein Misfolding Diseases // Annual review of biochemistry. 2017. Vol. 86. PP. 21–26. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-044518
2. Poewe W., Seppi K., Tanner C.M., Halliday G.M., Brundin P., Volkman J., Schrag A.E., Lang A.E. Parkinson disease // Nature reviews. Disease primers. 2017. Vol. 3. 17013. doi: 10.1038/nrdp.2017.13
3. Burré J., Sharma M., & Südhof T.C. Cell Biology and Pathophysiology of α -Synuclein // Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 2018. Vol. 8, № 3. a024091. doi: 10.1101/cshperspect.a024091

4. Gloeckner C.J., Boldt K., Schumacher A., Roepman R., Ueffing M. A novel tandem affinity purification strategy for the efficient isolation and characterisation of native protein complexes // *Proteomics*. 2007. Vol. 7, № 23. PP. 4228–4234. doi: 10.1002/pmic.200700038
5. Malakhova A.A., Pavlova S.V., Grigor'eva E.V., Medvedev S.P., Minina J.M., Vyatkin Y.V., Khabarova E.A., Rzaev J.A., Kovalenko L.V., Zakian S.M. An Induced Pluripotent Stem Cell Line (ICGi023-A) Obtained from a Patient with Parkinson's Disease Associated Polymorphisms in LRRK2 and PINK1 Genes // *Russian Journal of Developmental Biology*. 2023. Vol. 54. PP. 88–95. doi: 10.1134/S1062360423010071
6. Pavlova S.V., Valetdinova K.R., Malankhanova T.B., Polivtsev D.E., Malahova A.A., Grigor'eva E.V., Shevchenko A.I., Zakian S.M., Medvedev S.P. Transgenic Lines of Human Induced Pluripotent Stem Cells ICGi022-A-6 and ICGi022-A-7 with Doxycycline-Inducible Variants of Programmable Nuclease AsCas12a // *Russian Journal of Developmental Biology*. 2023. Vol. 54. PP. 374–386. doi: 10.1134/S1062360423060061
7. Патент № 2795156 Российская Федерация, МПК C12N 15/11 (2006.01), C12N 15/00 (2006.01), CПК C12N 15/00 (2023.02). Рекомбинантная плазмидная ДНК pSNCA-C-3XFLAG-2XST-donor, обеспечивающая стабильную доксициклин-управляемую экспрессию химерного белка альфа-синуклеина в культурах клеток человека: № 2022117570: заявл. 28.06.2022: опубл. 28.04.2023, Бюл. № 13/ Медведев С.П., Малахова А.А., Коваленко Л.В., Закиан С.М.; заявитель ИЦиГ СО РАН, СурГУ. 18 с.: ил.
8. Oosterveen T., Garção P., Moles-Garcia E., Soleilhavoup C., Travaglio M., Sheraz S., Peltirini R., Patrick K., Labas V., Combes-Soia L., Marklund U., Hohenstein P., Panman L. Pluripotent stem cell derived dopaminergic subpopulations model the selective neuron degeneration in Parkinson's disease // *Stem Cell Reports*. 2021. Vol. 16, № 11. PP. 2718–2735. doi: 10.1016/j.stemcr.2021.09.014
9. Li W., Chen S., Li J.Y. Human induced pluripotent stem cells in Parkinson's disease: A novel cell source of cell therapy and disease modeling // *Progress in neurobiology*. 2015. Vol. 134. PP. 161–77. doi: 10.1016/j.pneurobio.2015.09.009
10. Ran F.A., Hsu P.D., Wright J., Agarwala V., Scott D.A., Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system // *Nature protocols*. 2013. Vol. 8, № 11. PP. 2281–2308. doi: 10.1038/nprot.2013.143
11. DeKelver R.C., Choi V.M., Moehle E.A., Paschon D.E., Hockemeyer D., Meijsing S.H., Sancak Y., Cui X., Steine E.J., Miller J.C., Tam P., Bartsevich V.V., Meng X., Rupniewski J., Gopalan S.M., Sun H.C., Pitz K.J., Rock J.M., Zhang L., Davis G.D., Rebar E.J., Cheeseman I.M., Yamamoto K.R., Sabatini D.M., Jaenisch R., Gregory P.D., Urnov F.D. Functional genomics, proteomics, and regulatory DNA analysis in isogenic settings using zinc finger nuclease-driven transgenesis into a safe harbor locus in the human genome // *Genome research*. 2010. Vol. 20 (8), PP. 1133–42. doi: 10.1101/gr.106773.110
12. Marmolino D., Foerch P., Atienzar F.A., Staelens L., Michel A., Scheller D. Alpha synuclein dimers and oligomers are increased in overexpressing conditions in vitro and in vivo // *Molecular and cellular neurosciences*. 2016. Vol. 71, PP. 92–101. doi: 10.1016/j.mcn.2015.12.012

References

1. Hartl F.U. Protein Misfolding Diseases. *Annu Rev Biochem*. 2017;86:21-26. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-044518
2. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkman J, Schrag AE, Lang AE. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17013. doi: 10.1038/nrdp.2017.13
3. Burré J, Sharma M, Südhof TC. Cell Biology and Pathophysiology of α -Synuclein. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(3):a024091. doi: 10.1101/cshperspect.a024091
4. Gloeckner CJ, Boldt K, Schumacher A, Roepman R, Ueffing M. A novel tandem affinity purification strategy for the efficient isolation and characterisation of native protein complexes. *Proteomics*. 2007;7(23):4228-4234. doi: 10.1002/pmic.200700038

5. Malakhova AA, Pavlova SV, Grigor'eva EV, Medvedev SP, Minina JM, Vyatkin YV, Khabarova EA, Rzaev JA, Kovalenko LV, Zakian SM. An Induced Pluripotent Stem Cell Line (ICGi023-A) Obtained from a Patient with Parkinson's Disease Associated Polymorphisms in LRRK2 and PINK1 Genes. *Russ J Dev Biol.* 2023;54:88-95. doi: 10.1134/S1062360423010071
6. Pavlova SV, Valetdinova KR, Malankhanova TB, Polivtsev DE, Malakhova AA, Grigor'eva EV, Shevchenko AI, Zakian SM, Medvedev SP. Transgenic Lines of Human Induced Pluripotent Stem Cells ICGi022-A-6 and ICGi022-A-7 with Doxycycline-Inducible Variants of Programmable Nuclease AsCas12a. *Russ J Dev Biol.* 2023;54:374-386. doi: 10.1134/S1062360423060061
7. Patent N 2795156 Russian Federation, Int. Cl. C12N 15/11 (2006.01), C12N 15/00 (2006.01), C12N 15/00 (2023.02). Recombinant plasmid DNA pSN CAC-3X FLOW-2XST-donor, providing stable doxycycline-controlled expression of chimeric protein alpha-synuclein in human cell cultures: N 2022117570: register 28.06.2022: published 28.04.2023 / Medvedev SP, Malakhova AA, Kovalenko LV, Zakian SM; applicant ICG SB RAS, SurGU. 18 p.: fig. (In Russian).
8. Oosterveen T, Garção P, Moles-Garcia E, Soleilhavoup C, Travaglio M, Sheraz S, Peltrini R, Patrick K, Labas V, Combes-Soia L, Marklund U, Hohenstein P, Panman L. Pluripotent stem cell derived dopaminergic subpopulations model the selective neuron degeneration in Parkinson's disease. *Stem Cell Reports.* 2021;16(11):2718-2735. doi: 10.1016/j.stemcr.2021.09.014
9. Li W, Chen S, Li JY. Human induced pluripotent stem cells in Parkinson's disease: A novel cell source of cell therapy and disease modeling. *Prog Neurobiol.* 2015;134:161-77. doi: 10.1016/j.pneurobio.2015.09.009
10. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013;8(11):2281-2308. doi: 10.1038/nprot.2013.143
11. DeKelver RC, Choi VM, Moehle EA, Paschon DE, Hockemeyer D, Meijnsing SH, Sancak Y, Cui X, Steine EJ, Miller JC, Tam P, Bartsevich VV, Meng X, Rupniewski I, Gopalan SM, Sun HC, Pitz KJ, Rock JM, Zhang L, Davis GD, Rebar EJ, Cheeseman IM, Yamamoto KR, Sabatini DM, Jaenisch R, Gregory PD, Urnov FD. Functional genomics, proteomics, and regulatory DNA analysis in isogenic settings using zinc finger nuclease-driven transgenesis into a safe harbor locus in the human genome. *Genome Res.* 2010;20(8):1133-42. doi: 10.1101/gr.106773.110
12. Marmolino D, Foerch P, Atienzar FA, Staelens L, Michel A, Scheller D. Alpha synuclein dimers and oligomers are increased in overexpressing conditions in vitro and in vivo. *Mol Cell Neurosci.* 2016;71:92-101. doi: 10.1016/j.mcn.2015.12.012

Информация об авторах:

Малахова Анастасия Александровна, канд. биол. наук, с.н.с. лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН, н.с. лаборатории геномных медицинских технологий ИХБФМ СО РАН (Новосибирск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1916-1333>

E-mail: amal@bionet.nsc.ru

Аллаярова Элина Равильевна, студентка НГУ, лаборант-исследователь ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия).

Шарипова Динара Витальевна, лаборант ИЦиГ СО РАН (2016-2019) (Новосибирск, Россия).

Павлова Софья Викторовна, канд. биол. наук, н.с. лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН, с.н.с. лаборатории геномных медицинских технологий ИХБФМ СО РАН (Новосибирск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1095-3692>

E-mail: spav@bionet.nsc.ru

Григорьева Елена Викторовна, канд. биол. наук, с.н.с. лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН, н.с. лаборатории геномных медицинских технологий ИХБФМ СО РАН (Новосибирск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9162-9108>

E-mail: evlena@bionet.nsc.ru

Медведев Сергей Петрович, канд. биол. наук, в.н.с. лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН, с.н.с. лаборатории геномных медицинских технологий ИХБФМ СО РАН (Новосибирск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1520-5549>

E-mail: medvedev@bionet.nsc.ru

Закян Сурен Минасович, д-р биол. наук, зав. лабораторией эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН, г.н.с. лаборатории геномных медицинских технологий ИХБФМ СО РАН (Новосибирск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2448-6511>

E-mail: zakian@bionet.nsc.ru

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Information about the authors:

Anastasia A. Malakhova, Cand.Sci. (Biol.), Senior Researcher at the Laboratory of Developmental Epigenetics ICG SB RAS, Researcher at the Laboratory of Genomic Medical Technologies ICBFM SB RAS (Novosibirsk, Russia).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1916-1333>

E-mail: amal@bionet.nsc.ru

Elina R. Allayarova, student of NSU, research laboratory assistant at ICiG SB RAS (Novosibirsk, Russia).

Dinara V. Sharipova, laboratory assistant at ICiG SB RAS (2016-2019) (Novosibirsk, Russia).

Sophia V. Pavlova, Cand.Sci. (Biol.), Researcher at the Laboratory of Developmental Epigenetics ICG SB RAS, Senior Researcher at the Laboratory of Genomic Medical Technologies ICBFM SB RAS (Novosibirsk, Russia).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1095-3692>

E-mail: spav@bionet.nsc.ru

Elena V. Grigor'eva, Cand.Sci. (Biol.), Senior Researcher at the Laboratory of Developmental Epigenetics ICG SB RAS, Researcher at the Laboratory of Genomic Medical Technologies ICBFM SB RAS (Novosibirsk, Russia).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9162-9108>

E-mail: evlena@bionet.nsc.ru

Sergey P. Medvedev, Cand.Sci. (Biol.), Leading Researcher at the Laboratory of Developmental Epigenetics ICG SB RAS, Leading Researcher at the Laboratory of Genomic Medical Technologies ICBFM SB RAS (Novosibirsk, Russia).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1520-5549>

E-mail: medvedev@bionet.nsc.ru

Suren M. Zakian, D.Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Developmental Epigenetics ICG SB RAS, Principal Investigator at the Laboratory of Genomic Medical Technologies ICBFM SB RAS (Novosibirsk, Russia).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2448-6511>

E-mail: zakian@bionet.nsc.ru

The Authors declare no conflict of interest.

*Статья поступила в редакцию 01.08.2024;
одобрена после рецензирования 29.10.2024; принята к публикации 03.03.2025.*

*The article was submitted 01.08.2024;
approved after reviewing 29.10.2024; accepted for publication 03.03.2025.*

Научная статья

УДК 575.162

doi: 10.17223/19988591/69/13

Направленное редактирование геномов индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека как инструмент функционального анализа генетических вариантов

Сергей Петрович Медведев¹, Валерия Игоревна Ахмерова²,
Юлия Андреевна Надточий³, Елена Викторовна Григорьева⁴,
Софья Викторовна Павлова⁵, Сурен Минасович Закиян⁶

^{1, 2, 3, 4, 5, 6} Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия
^{1, 4, 5, 6} Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия

^{2, 3} Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

¹ <https://orcid.org/0000-0002-1520-5549>, medvedev@bionet.nsc.ru

² v.akhmerova@g.nsu.ru

³ y.nadtochii@g.nsu.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0002-9162-9108>, evlana@bionet.nsc.ru

⁵ <https://orcid.org/0000-0003-1095-3692>, spav@bionet.nsc.ru

⁶ <https://orcid.org/0000-0003-2448-6511>, zakian@bionet.nsc.ru

Аннотация. Развитие высокопроизводительных методов геномики привело к появлению огромных массивов информации и обширных баз данных о полиморфизмах или генетических вариантах, встречающихся в геномах пациентов с заболеваниями различных органов и систем. Однако лишь для небольшой доли генетических вариантов подтвержден патологический статус и проведены подробные исследования молекулярно-генетических механизмов, вызванных ими патологических процессов, что требует создания новых модельных систем. Нами был исследован потенциал применения программируемой нуклеазы AsCas12a для внесения двуцепочечных разрывов ДНК в локусах, ассоциированных с нейродегенеративными и сердечно-сосудистыми заболеваниями человека (*MYBPC3*, *APOE*, *PSEN1*, *LRRK2*, *PINK1* и *PRKN*), а также для внесения трансгена EGFP в локус *SOX6* генома индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) здорового человека. Кроме того, с помощью CRISPR/Cas9-опосредованной гомологичной рекомбинации в локусе *AAVS1* были получены ИПСК здорового донора и пациента с генетическим вариантом с.2013T>G (rs63750756, p.N279K) в гене *MAPT*, которые несут доксициклин-управляемый трансген биосенсора MitoTimer. В результате было установлено, что нуклеаза AsCas12a может применяться для нокаута генов и стимуляции гомологичной рекомбинации в геномах ИПСК человека, а также получена модель для исследования болезни Паркинсона в клетках с патогенным полиморфизмом в гене *MAPT*, ассоциированным с лобно-височной деменцией с паркинсонизмом-17.

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, клеточные модели, болезнь Паркинсона, лобно-височная деменция с паркинсонизмом-17, редактирование геномов, AsCas12a, SpCas9

Источник финансирования: исследование выполнено при финансовой поддержке Фонда научно-технологического развития Югры в рамках научного проекта № 2023-573-05.

Для цитирования: Медведев С.П., Ахмерова В.И., Надточий Ю.А., Григорьева Е.В., Павлова С.В., Закиан С.М. Направленное редактирование геномов индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека как инструмент функционального анализа генетических вариантов // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2025. № 69. С. 113–121. doi: 10.17223/19988591/69/13

Original article

doi: 10.17223/19988591/69/13

Targeted editing of human induced pluripotent stem cells genomes as a tool for functional analysis of genetic variants

Sergey P. Medvedev¹, Valeria I. Akhmerova², Julia A. Nadtochy³,
Elena V. Grigor'eva⁴, Sofia V. Pavlova⁵, Suren M. Zakian⁶

^{1, 2, 3, 4, 5, 6} Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

^{1, 4, 5, 6} Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia

^{2, 3} Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

¹ <https://orcid.org/0000-0002-1520-5549>, medvedev@bionet.nsc.ru

² v.akhmerova@g.nsu.ru

³ y.nadtochii@g.nsu.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0002-9162-9108>, evlana@bionet.nsc.ru

⁵ <https://orcid.org/0000-0003-1095-3692>, spav@bionet.nsc.ru

⁶ <https://orcid.org/0000-0003-2448-6511>, zakian@bionet.nsc.ru

Summary. The creation of models that are designed to study the molecular genetic mechanisms of disease development, search for target molecules and test potential drugs and technologies is one of the current areas of modern biomedicine. An alternative to the use of animal models is cellular models, in particular those based on the use of differentiated derivatives of induced pluripotent stem cells. Genome editing tools, for example, CRISPR-mediated systems, make it possible to artificially create various genetic variants (single nucleotide polymorphisms, deletions, insertions, etc.), and can also be used to stimulate homologous recombination during targeted transgenesis. The combination of these systems with the technology of induced pluripotent stem cells makes them a unique tool for creating models of human hereditary pathologies. In this work, we used clones of human induced pluripotent stem cells of the ICGi022-A line (<https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi022-A>), which carry transgenes of two variants of the AsCas12a nuclease that recognize different PAM consensus sequences (ICGi022-A-6 (As-Cas12a, PAM 5'-TTTV-3') and ICGi022-A-7 (AsCas12a, PAM 5'-TYCV-3')), and the reverse doxycycline-dependent transactivator transgene M2rtTA. The work also used induced pluripotent stem cells from a healthy donor and a patient with the genetic variant c.2013T > G (rs63750756, p.N279K) in the *MAPT* gene. All lines of induced pluripotent stem cells were obtained by the authors previously. Protospacers for AsCas12a were selected using the Benchling platform (<https://www.benchling.com/>). The selection took into account potential off-target activity and proximity to the point of interest in the genome. Constructs for expression of AsCas12a gRNA were created based on the pTE4560 vector (Addgene #107526). T7EI analysis was used to study the efficiency of AsCas12a. Gibson's method was used to assemble the pSOX6-T2A-EGFP-HygroR plasmid construct. To obtain clones of cells with the MitoTimer transgene, pX458-AAVS1 and pAAVS1-TRE-mCMV-MitoTimer constructs created by molecular cloning were used. The donor plasmid AAVS1-Neo-M2rtTA, encoding the reverse tetracycline transactivator, was obtained from the Addgene depository (Addgene #60843). PCR was used to analyze transgenic cell clones. The creation of isogenic cell models,

including knockout cell lines and lines carrying various genetic variants (single nucleotide polymorphisms, deletions and insertions), as well as transgenic cell lines, is an urgent biomedical task. Our study shows that the programmable nuclease AsCas12a (PAM consensus - 5'-TTTV-3') introduces double-stranded DNA breaks in the loci of the genomes of human induced pluripotent stem cells, which are associated with neurodegenerative and cardiovascular diseases (*MYBPC3* - efficiency (T7EI) $16.2 \pm 1.42\%$ and $13.4 \pm 0.91\%$, *APOE* - $25.3 \pm 1.76\%$, *LRRK2* - $23.5 \pm 1.86\%$ and $11.4 \pm 0.04\%$, *PRKN* - $20.6 \pm 0.63\%$ and $9.6 \pm 0.01\%$, *PSEN1* - $3.3 \pm 0.01\%$ and $4.2 \pm 0.01\%$, *PINK1* - $8.0 \pm 0.02\%$), which makes it a promising tool for knocking out genes and stimulating the process of homologous recombination in this type of cell. In this case, induced pluripotent stem cell lines carrying the doxycycline-driven transgene for the programmable nuclease AsCas12a can be used to create isogenic cellular models of pathological processes. In addition, it was established that in the line of human induced pluripotent stem cells carrying the AsCas12a transgene (PAM consensus - 5'-TYCV-3'), successful AsCas12a-mediated homologous recombination of the 3' region of the *SOX6* gene occurs with the plasmid donor construct, which is intended to mark the expression of the SOX6 transcription factor using the fluorescent protein EGFP, which shows the promise of using this cell line to create transgenic human induced pluripotent stem cells. By CRISPR/SpCas9-mediated homologous recombination at the *AAVS1* locus, three clones of induced pluripotent stem cells from a healthy donor and four clones of induced pluripotent stem cells from a patient with the genetic variant c.2013T > G (rs63750756, p.N279K) in the *MAPT* gene, which carry doxycycline, were obtained -transgene-driven biosensor MitoTimer. It was confirmed that the resulting transgenic clones of induced pluripotent stem cells express markers of self-renewal and pluripotency of human cells, have a normal karyotype and can be differentiated into derivatives of the three primitive germ layers - ectoderm, mesoderm, endoderm. Thus, the combined use of induced pluripotent stem cell technology and programmable nucleases AsCas12a and SpCas9 makes it possible to create a wide range of cellular models, including pluripotent cell lines with knockout of genes associated with hereditary human diseases, and transgenic lines designed for live-cell visualization of cellular processes.

The article contains 8 References.

Keywords: induced pluripotent stem cells, cell models, Parkinson's disease, frontotemporal dementia with parkinsonism-17, genome editing, AsCas12a, SpCas9

Fundings: The reported study was funded by Foundation for Scientific and Technological Development of Yugra according to research project № 2023-573-05.

For citation: Medvedev SP, Akhmerova VI, Nadtochy JA, Grigor'eva EV, Pavlova SV, Zakian SM. Targeted editing of human induced pluripotent stem cells genomes as a tool for functional analysis of genetic variants. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya* = *Tomsk State University Journal of Biology*. 2025;69:113-121. doi: 10.17223/19988591/69/13

Введение

Создание моделей, которые предназначены для изучения молекулярно-генетических механизмов развития болезней, поиска молекул-мишеней и тестирования потенциальных лекарственных препаратов и технологий, является одним из актуальных направлений современной биомедицины. В настоящий момент подавляющее большинство фундаментальных и прикладных фармацевтических исследований осуществляется с применением грызунов (мышей и крыс) в качестве модельных организмов. Однако суще-

ствуют примеры, когда животные модели не способны в полной мере отразить проявления болезни на молекулярном и клеточном уровнях. Например, существуют значительные проблемы при создании животных моделей нейродегенеративных и сердечно-сосудистых заболеваний. Альтернативой использованию животных моделей являются клеточные модели, в частности, основанные на применении дифференцированных производных ИПСК. ИПСК могут быть направленно дифференцированы в практически любой тип клеток, они способны к самообновлению, что решает проблему получения труднодоступных типов клеток, например нейронов или кардиомиоцитов.

Создание клеточных модельных систем требует применения инструментов редактирования геномов, которые обладают двумя свойствами – высокой точностью и эффективностью работы в используемом типе клеток. В нашей работе мы исследовали возможность применения программируемой нуклеазы AsCas12a для редактирования геномов ИПСК человека. Существуют экспериментальные доказательства того, что данный фермент работает более специфично по сравнению с наиболее часто применяемой нуклеазой SpCas9 [1]. Его можно использовать для мультиплексного редактирования генов, так как он способен к процессированию направляющей РНК [2]. Однако AsCas12a обладает сравнительно низкой активностью и не может вносить разрыв в некоторые участки генома, что связывают с большей плотностью нуклеосом в этих районах [3].

Исследование моделей на основе ИПСК требует применения методических подходов, которые бы позволили исследовать физиологические и биохимические параметры на живых клетках в режиме реального времени. Одним из таких подходов является использование генетически кодируемых биосенсоров. В данной работе мы применили систему CRISPR/SpCas9 для создания ИПСК пациента с вариантом с.2013T > G (rs63750756, p.N279K) в гене *MAPT* и здорового донора, несущих доксициклин-управляемый трансген биосенсора MitoTimer [4]. Данный генетический вариант в гене *MAPT* ассоциирован с лобно-височной деменцией с паркинсонизмом-17. Это нейродегенеративное заболевание, характеризующееся патологической агрегацией белка тау с образованием нейрофибриллярных клубков и дальнейшей гибелью нейронов. Белок тау, кодируемый геном *MAPT*, регулирует сборку и стабилизацию микротрубочек, участвуя в передаче сигнала в ЦНС и аксональном транспорте. Генетический вариант с.2013T > G (rs63750756, p.N279K) в гене *MAPT* приводит к нарушению взаимодействия белка тау с микротрубочками, образованию нитевидных включений и последующей гибели нейронов, что приводит к развитию лобно-височной деменции с паркинсонизмом-17 [5]. Точный механизм развития болезни при этом генетическом варианте пока не известен, что не позволяет выработать схему лечения. Использование биосенсорных систем, в частности, биосенсора MitoTimer, может способствовать более глубокому пониманию патологических процессов, происходящих в живых клетках.

Цель работы – исследование спектра и эффективности применения программируемых нуклеаз AsCas12a и SpCas9 для направленного редактирования геномов ИПСК человека при создании клеточных моделей заболеваний человека.

Материалы и методы

В данной работе мы использовали клоны индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека линии ICGi022-A (<https://hpscreg.eu/cell-line/ICGi022-A>), которые несут трансгены двух вариантов нуклеазы AsCas12a, распознающих разные консенсусы PAM (ICGi022-A-6 (AsCas12a, PAM 5'-TTTV-3') и ICGi022-A-7 (AsCas12a, PAM 5'-TYCV-3')), и трансген обратного доксициклин-зависимого транскриптора M2rtTA [6]. Также в работе были использованы индуцированные плюрипотентные стволовые клетки здорового донора и пациента с генетическим вариантом с.2013T > G (rs63750756, p.N279K) в гене *MAPT*. Все линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток получены авторами ранее. Протоспейсеры для AsCas12a выбирали с помощью Web-платформы Benchling (<https://www.benchling.com/>). Конструкции для экспрессии нРНК AsCas12a создавали на основе вектора pTE4560 (Addgene #107526). Для исследования эффективности работы AsCas12a использовали T7EI-анализ. Для сборки плазмидной конструкции pSOX6-T2A-EGFP-HygroR применяли метод Гибсона. Для получения клонов клеток с трансгеном MitoTimer были использованы конструкции pX458-AAVS1 и pAAVS1-TRE-mCMV-MitoTimer, созданные методом молекулярного клонирования. Донорная плаزمида AAVS1-Neo-M2rtTA, кодирующая обратный тетрациклиновый транскриптор, была получена из депозитария Addgene (Addgene #60843). Для доставки конструкций в клетки применяли липофекцию (Lipofectamine3000 Transfection Reagent, «Thermo Fisher Scientific», США) или электропорацию (Neon Transfection System, «Thermo Fisher Scientific», США) с последующим отбором трансгенных клонов с помощью сред, содержащих соответствующие антибиотики (неомицин и пурамицин). Для анализа клонов трансгенных клеток использовали ПЦР.

Результаты исследования и обсуждение

В нашем исследовании показано, что программируемая нуклеаза AsCas12a (консенсус PAM – 5'-TTTV-3') вносит двуцепочечные разрывы ДНК в локусах геномов ИПСК человека, которые ассоциированы с нейродегенеративными и сердечно-сосудистыми заболеваниями (*MYBPC3* – эффективность (T7EI) $16,2 \pm 1,42\%$ и $13,4 \pm 0,91\%$, *APOE* – $25,3 \pm 1,76\%$, *LRRK2* – $23,5 \pm 1,86\%$ и $11,4 \pm 0,04\%$, *PRKN* – $20,6 \pm 0,63\%$ и $9,6 \pm 0,01\%$, *PSEN1* – $3,3 \pm 0,01\%$ и $4,2 \pm 0,01\%$, *PINK1* – $8,0 \pm 0,02\%$), что делает ее перспективным инструментом для нокаута генов и стимуляции процесса гомологичной рекомбинации в данном типе клеток. При этом линии ИПСК, несущие доксициклин-управляемый трансген программируемой нуклеазы AsCas12a, можно применять для создания изогенных клеточных моделей патологических процессов. Кроме того, установлено, что в линии ИПСК человека, несущей трансген AsCas12a (консенсус PAM – 5'-TYCV-3'), происходит успешная AsCas12a-опосредованная гомологичная рекомбинация 3'-об-

ласти гена *SOX6* с плазмидной донорной конструкцией, которая предназначена для маркирования экспрессии транскрипционного фактора *SOX6* с помощью флуоресцентного белка EGFP, что показывает перспективность использования данной линии клеток для создания трансгенных ИПСК человека. Нуклеаза AsCas12a показала значительный уровень модификации почти во всех анализируемых локусах. Возможно, это связано с выбранным нами подходом: AsCas12a не вносится в виде плазмиды или белка, а экспрессируется в клетке в ответ на добавление в культуральную среду доксициклина, что упрощает процесс редактирования и повышает его эффективность, так как во всех анализируемых клетках присутствует нуклеаза AsCas12a. Таким образом, AsCas12a можно эффективно использовать для внесения инсерций/делеций и нокаута генов.

Полученный нами уровень модификаций не является максимально возможным. Уже сейчас получены несколько мутантных AsCas12a, эффективность внесения разрывов которыми достигает 90% в определенных типах клеток [7], но, к сожалению, часть из этих ферментов показывают более высокую неспецифическую активность [8].

Путем CRISPR/SpCas9-опосредованной гомологичной рекомбинации в локусе *AAVS1* получено три клона ИПСК здорового донора и четыре клона ИПСК пациента с генетическим вариантом с.2013T>G (rs63750756, p.N279K) в гене *MAPT*, которые несут доксициклин-управляемый трансген биосенсора MitoTimer. Подтверждено, что полученные трансгенные клоны ИПСК экспрессируют маркеры самообновления и плюрипотентности клеток человека, имеют нормальный кариотип и могут быть дифференцированы в производные трех примитивных зародышевых листков – эктодермы, мезодермы, энтодермы. Биосенсор MitoTimer – локализующийся в митохондриях зеленый флуоресцентный белок Timer, слитый с сигнальным пептидом субъединицы COX8A, который определяет локализацию MitoTimer в митохондриальном матриксе. После транляции и фолдинга MitoTimer флуоресцирует зеленым, а со временем пик эмиссии меняется на красный. Наблюдаемая эмиссия MitoTimer будет зависеть от продолжительности экспрессии и скорости включения и деградации белка в митохондриях. Это позволяет изучать темп биогенеза, относительный уровень оксидативного стресса и повреждение митохондрий [4]. Исследование работы биосенсора MitoTimer в дифференцированных производных пациент-специфичных ИПСК (дофаминергических нейронах) может дать новую информацию о молекулярно-генетических и биохимических механизмах патогенеза лобно-височной деменции с паркинсонизмом-17.

Заключение

Совместное использование технологии ИПСК и программируемых нуклеаз AsCas12a и SpCas9 позволяет создавать широкий спектр клеточных моделей, включая линии плюрипотентных клеток с нокаутом генов, ассоциированных с наследственными болезнями человека, а также трансгенные линии, предназначенные для прижизненной визуализации клеточных процессов.

Список источников

1. Kim D., Kim J., Hur J.K., Been K.W., Yoon S.H., Kim J.S. Genome-wide Analysis Reveals Specificities of Cpf1 Endonucleases in Human Cells // *Nature Biotechnology*. 2016. Vol. 34, № 8. PP. 863–868. doi: 10.1038/nbt.3609
2. Zetsche B., Heidenreich M., Mohanraju P., Fedorova I., Kneppers J., DeGennaro E.M., Winblad N., Choudhury S.R., Abudayyeh O.O., Gootenberg J.S., Wu W.Y., Scott D.A., Severinov K., van der Oost J., Zhang F. Multiplex Gene Editing by CRISPR-Cpf1 Using a Single crRNA Array // *Nature Biotechnology*. 2017. Vol. 35, № 1. PP. 31–34. doi: 10.1038/nbt.3737
3. Strohkendl I., Saifuddin F.A., Gibson B.A., Rosen M.K., Russell R., Finkelstein I.J. Inhibition of CRISPR-Cas12a DNA Targeting by Nucleosomes and Chromatin // *Science Advances*. 2021. Vol. 7, № 11. eabd6030. doi: 10.1126/sciadv.abd6030
4. Laker R.C., Xu P., Ryall K.A., Sujkowski A., Kenwood B.M., Chain K.H., Zhang M., Royal M.A., Hoehn K.L., Driscoll M., Adler P.N., Wessells R.J., Saucerman J.J., Yan Z. A Novel MitoTimer Reporter Gene for Mitochondrial Content, Structure, Stress, and Damage In Vivo // *Journal of Biological Chemistry*. 2014. Vol. 289, № 17. PP. 12005–12015. doi: 10.1074/jbc.M113.530527
5. Ghetti B., Oblak A.L., Boeve B.F., Johnson K.A., Dickerson B.C., Goedert M. Invited Review: Frontotemporal Dementia Caused by Microtubule-associated Protein Tau Gene (MAPT) Mutations: a Chameleon for Neuropathology and Neuroimaging // *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2015. Vol. 41, № 1. PP. 24–46. doi: 10.1111/nan.12213
6. Павлова С.В., Валетдинова К.Р., Маланханова Т.Б., Полищев Д.Е., Малахова А.А., Григорьева Е.В., Шевченко А.И., Закиян С.М., Медведев С.П. Трансгенные линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека ICG1022-A-6 и ICG1022-A-7 с доксициклин-управляемыми вариантами программируемой нуклеазы AsCas12a // *Онтогенез*. 2023. Т. 54, № 6. С. 415–428. doi: 10.31857/S047514502306006X
7. Zhang L., Zuris J.A., Viswanathan R., Edelstein J.N., Turk R., Thommandru B., Rube H.T., Glenn S.E., Collingwood M.A., Bode N.M., Beaudoin S.F., Lele S., Scott S.N., Wasko K.M., Sexton S., Borges C.M., Schubert M.S., Kurgan G.L., McNeill M.S., Fernandez C.A., Myer V.E., Morgan R.A., Behlke M.A., Vakulskas C.A. AsCas12a Ultra Nuclease Facilitates the Rapid Generation of Therapeutic Cell Medicines // *Nature Communications*. 2021. Vol. 12, № 1. 3908. doi: 10.1038/s41467-021-24017-8
8. Kim H., Lee W.J., Kim C.H., Oh Y., Gwon L.W., Lee H., Song W., Hur J.K., Lim K.S., Jeong K.J., Nam K.H., Won Y.S., Lee K.R., Lee Y., Kim Y.H., Huh J.W., Jun B.H., Lee D.S., Lee S.H. Highly Specific Chimeric DNA-RNA-guided Genome Editing with Enhanced CRISPR-Cas12a System // *Molecular Therapy Nucleic Acids*. 2022. Vol. 28. PP. 353–362. doi: 10.1016/j.omtn.2022.03.021

References

1. Kim D, Kim J, Hur JK, Been KW, Yoon SH, Kim JS. Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells. *Nat Biotechnol*. 2016;34(8):863-868. doi: 10.1038/nbt.3609
2. Zetsche B, Heidenreich M, Mohanraju P, Fedorova I, Kneppers J, DeGennaro EM, Winblad N, Choudhury SR, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Wu WY, Scott DA, Severinov K, van der Oost J, Zhang F. Multiplex gene editing by CRISPR-Cpf1 using a single crRNA array. *Nat Biotechnol*. 2017;35(1):31-34. doi: 10.1038/nbt.3737
3. Strohkendl I, Saifuddin FA, Gibson BA, Rosen MK, Russell R, Finkelstein IJ. Inhibition of CRISPR-Cas12a DNA targeting by nucleosomes and chromatin. *Sci Adv*. 2021;7(11):eabd6030. doi: 10.1126/sciadv.abd6030
4. Laker RC, Xu P, Ryall KA, Sujkowski A, Kenwood BM, Chain KH, Zhang M, Royal MA, Hoehn KL, Driscoll M, Adler PN, Wessells RJ, Saucerman JJ, Yan Z. A novel MitoTimer reporter gene for mitochondrial content, structure, stress, and damage in vivo. *J Biol Chem*. 2014;289(17):12005-12015. doi: 10.1074/jbc.M113.530527

5. Ghetti B, Oblak AL, Boeve BF, Johnson KA, Dickerson BC, Goedert M. Invited review: Frontotemporal dementia caused by microtubule-associated protein tau gene (MAPT) mutations: a chameleon for neuropathology and neuroimaging. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2015;41(1):24-46. doi: 10.1111/nan.12213
6. Pavlova SV, Valetdinova KR, Malankhanova TB, Polivtsev DE, Malahova AA, Grigor'eva EV, Shevchenko AI, Zakian SM, Medvedev SP. Transgenic Lines of Human Induced Pluripotent Stem Cells ICGi022-A-6 and ICGi022-A-7 with Doxycycline-Inducible Variants of Programmable Nuclease AsCas12a. *Russ J Dev Biol.* 2023;54(6):374-386. doi: 10.1134/S1062360423060061
7. Zhang L, Zuris JA, Viswanathan R, Edelstein JN, Turk R, Thommandru B, Rube HT, Glenn SE, Collingwood MA, Bode NM, Beaudoin SF, Lele S, Scott SN, Wasko KM, Sexton S, Borges CM, Schubert MS, Kurgan GL, McNeill MS, Fernandez CA, Myer VE, Morgan RA, Behlke MA, Vakulskas CA. AsCas12a ultra nuclease facilitates the rapid generation of therapeutic cell medicines. *Nat Commun.* 2021;12(1):3908. doi: 10.1038/s41467-021-24017-8
8. Kim H, Lee WJ, Kim CH, Oh Y, Gwon LW, Lee H, Song W, Hur JK, Lim KS, Jeong KJ, Nam KH, Won YS, Lee KR, Lee Y, Kim YH, Huh JW, Jun BH, Lee DS, Lee SH. Highly specific chimeric DNA-RNA-guided genome editing with enhanced CRISPR-Cas12a system. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2022;28:353-362. doi: 10.1016/j.omtn.2022.03.021

Информация об авторах:

Медведев Сергей Петрович, канд. биол. наук, в.н.с. лаборатории эпигенетики развития Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия); с.н.с. лаборатории геномных медицинских технологий Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН (Новосибирск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1520-5549>

E-mail: medvedev@bionet.nsc.ru

Ахмерова Валерия Игоревна, лаборант-исследователь лаборатории эпигенетики развития Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия); студент кафедры цитологии и генетики Новосибирского государственного университета (Новосибирск, Россия).

E-mail: v.akhmerova@g.nsu.ru

Надточий Юлия Андреевна, лаборант-исследователь лаборатории эпигенетики развития Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия); студент кафедры цитологии и генетики Новосибирского государственного университета (Новосибирск, Россия).

E-mail: y.nadtochii@g.nsu.ru

Григорьева Елена Викторовна, канд. биол. наук, с.н.с. лаборатории эпигенетики развития Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия); н.с. лаборатории геномных медицинских технологий Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9162-9108>

E-mail: evlana@bionet.nsc.ru

Павлова Софья Викторовна, канд. биол. наук, н.с. лаборатории эпигенетики развития Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия); н.с. лаборатории геномных медицинских технологий Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1095-3692>

E-mail: spav@bionet.nsc.ru

Закян Сурен Минасович, д-р биол. наук, профессор, г.н.с., зав. лабораторией эпигенетики развития Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия); г.н.с. лаборатории геномных медицинских технологий Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2448-6511>

E-mail: zakian@bionet.nsc.ru

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Information about the authors:

Sergey P. Medvedev, Cand.Sci. (Biol.), Leading Researcher of the Laboratory of Developmental Epigenetics, Cytology and Genetics, SB RAS (Novosibirsk, Russian Federation); Senior Researcher of the Laboratory of genomic medical technologies, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS (Novosibirsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1520-5549>

E-mail: medvedev@bionet.nsc.ru

Valeria I. Akhmerova, Research Assistant of the Laboratory of Developmental Epigenetics, Institute of Cytology and Genetics SB RAS (Novosibirsk, Russian Federation); Graduate Student, Department of Cytology and Genetics, Novosibirsk State University (Novosibirsk, Russian Federation).

E-mail: v.akhmerova@g.nsu.ru

Julia A. Nadtochy, Research Assistant of the Laboratory of Developmental Epigenetics, Cytology and Genetics, SB RAS (Novosibirsk, Russian Federation); Graduate Student, Department of Cytology and Genetics, Novosibirsk State University (Novosibirsk, Russian Federation).

E-mail: y.nadtochii@g.nsu.ru

Elena V. Grigor'eva, Cand.Sci. (Biol.), Senior Researcher of the Laboratory of Developmental Epigenetics, Institute of Cytology and Genetics, SB RAS (Novosibirsk, Russian Federation); Researcher of the Laboratory of genomic medical technologies, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS (Novosibirsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9162-9108>

E-mail: evlena@bionet.nsc.ru

Sofia V. Pavlova, Cand.Sci. (Biol.), Researcher of the Laboratory of Developmental Epigenetics, Cytology and Genetics, SB RAS (Novosibirsk, Russian Federation); Researcher of the Laboratory of genomic medical technologies, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS (Novosibirsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1095-3692>

E-mail: spav@bionet.nsc.ru

Suren M. Zakian, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Chief Researcher, Head of the Laboratory of Developmental Epigenetics, Institute of Cytology and Genetics, SB RAS (Novosibirsk, Russian Federation); Chief Researcher of the Laboratory of genomic medical technologies, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS (Novosibirsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2448-6511>

E-mail: zakian@bionet.nsc.ru

The Authors declare no conflict of interest.

*Статья поступила в редакцию 25.08.2024;
одобрена после рецензирования 29.10.2024; принята к публикации 03.03.2025.*

*The article was submitted 25.08.2024;
approved after reviewing 29.10.2024; accepted for publication 03.03.2025.*

Научная статья

УДК 616-006

doi: 10.17223/19988591/69/14

Получение гетероклеточных сфероидов для моделирования метастазов в печени

Ксения Владимировна Невская¹, Лина Викторовна Ефимова²,
Полина Константиновна Козлова³, Александра Геннадьевна Першина⁴,
Елена Владимировна Удуг⁵

^{1, 2, 3, 4, 5} Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия,

¹ <https://orcid.org/0000-0003-1659-8812>, nevskayaksenia@gmail.com

² <https://orcid.org/0000-0002-7168-1419>, efimova.lina@gmail.com

³ kozlovapolina13@mail.ru

⁴ <http://orcid.org/0000-0001-7604-9722>, allysyzy@mail.ru

⁵ <https://orcid.org/0000-0002-6104-4782>, udut.ev@ssmu.ru

Аннотация. Моделирование процессов, происходящих на различных этапах метастазирования раковой опухоли, является крайне перспективным направлением в современной медицине и может быть использовано для разработки эффективных противоопухолевых (антиметастатических) препаратов. Одним из ключевых этапов метастатического каскада является дедифференцировка опухолевых клеток в метастатической нише и их последующая пролиферация, приводящая к формированию вторичного опухолевого узла. Целью данного исследования являлось моделирование этапа дедифференцировки опухолевых клеток рака молочной железы в гетероклеточных сфероидах, состоящих из клеток печени человека линии HepG2, иммортализованных фибробластов BJ-5ta, M0-макрофагов. Показано, что под действием интерлейкина 6 CD44⁺ дифференцированные опухолевые клетки линии рака молочной железы человека T47D, экспрессирующей красный флуоресцентный белок RFP, в составе гетеросфероидов печени начинают активно пролиферировать. Это свидетельствует о процессе их дедифференцировки и начале формирования вторичного опухолевого узла. Жизнеспособность клеток в составе гетеросфероида подтверждали с использованием витального красителя Calcein AM. Таким образом, нами предложена модель метастаза рака молочной железы в печень на основе гетероклеточных сфероидов, предназначенная для повышения эффективности скрининга противоопухолевых препаратов.

Ключевые слова: онкология, метастазы, сфероиды, печень, рак молочной железы, интерлейкин 6

Для цитирования: Невская К.В., Ефимова Л.В., Козлова П.К., Першина А.Г., Удуг Е.В. Получение гетероклеточных сфероидов для моделирования метастазов в печени // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2025. № 69. С. 122–129. doi: 10.17223/19988591/69/14

Heterocellular spheroids as a model of liver metastasis

Kseniya V. Nevskaya¹, Lina V. Efimova², Polina K. Kozlova³,
Alexandra G. Pershina⁴, Elena V. Udut⁵

^{1, 2, 3, 4, 5} *Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation*

¹ <https://orcid.org/0000-0003-1659-8812>, nevskayaksenia@gmail.com

² <https://orcid.org/0000-0002-7168-1419>, efimova.lina@gmail.com

³ kozlovapolina13@mail.ru

⁴ <http://orcid.org/0000-0001-7604-9722>, allysyz@mail.ru

⁵ <https://orcid.org/0000-0002-6104-4782>, udut.ev@ssmu.ru

Summary. Modeling the processes occurring at various stages of cancer tumor metastasis is the basis for developing effective antimetastatic drugs. One of the most promising targets for antimetastatic therapy are single tumor cells in a dormant state in the liver, lungs, bones and/or other organs of patients - micrometastases. At the time of diagnosis of a malignant neoplasm, almost all patients already have multiple micrometastases. Under certain conditions, a single dormant tumor cell transitions into a stem-like cell, and the growth of a secondary tumor node - macrometastasis - begins. The aim of this work was to model the transition of breast cancer micrometastasis into macrometastasis in heterocellular spheroids consisting of human liver cells, fibroblasts, and M0 macrophages. To model dormant tumor cells using the fluorescence-activated sorting method, a population of CD44-differentiated cells of the genetically modified T47D cell line expressing the red fluorescent protein RFP (T47D_Red) was isolated. To obtain liver heterospheroids, human hepatoma cells of the HepG2 line, immortalized human fibroblasts of the BJ-5ta line, M0 macrophages obtained from monocytes of the peripheral blood of healthy donors, and CD44 cells of the human breast cancer line T47D_Red were mixed in a ratio of 15:1:1:1 in a DMEM/F12 medium supplemented with 10% fetal calf serum, L-glutamine, and an antibiotic-antimycotic (*Fig. 1a-e*). IL6 was added to the medium to induce dedifferentiation of cancer cells within the heterospheroid. This resulted in the proliferation of single breast cancer cells and the formation of secondary tumor foci in the heterospheroid structure (*Fig. 1g-j*) by the 5th day of cultivation. It is important to note that the cells in the heterospheroid retained their viability for 7 days of cultivation (*Fig. 1f, k*). Thus, a model for the formation of breast cancer metastasis in the liver has been proposed. The advantage of the model is the ability to take into account intercellular interactions due to the inclusion of several cell types, which increases the efficiency of in vitro testing of promising antimetastatic, including immunotherapeutic and gene therapeutic, drugs using the proposed model.

The article contains 1 Figure, 11 References.

Keywords: oncology, metastasis, spheroids, liver, breast cancer, interleukin 6

For citation: Nevskaya KV, Efimova LV, Kozlova PK, Pershina AG, Udut EV. Heterocellular spheroids as a model of liver metastasis. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2025;69: 122-129. doi: 10.17223/19988591/69/14

Введение

Моделирование процессов, происходящих на различных этапах метастатического каскада, является важной исследовательской задачей, решение которой необходимо как для изучения механизмов метастазирования, так и

для разработки новых эффективных противоопухолевых (антиметастатических) лекарств. Одной из наиболее перспективных мишеней для антиметастатической терапии являются единичные опухолевые клетки, находящиеся в dormantном состоянии в печени, легких, костях и/или других органах пациентов, – микрометастазы [1]. На момент постановки диагноза злокачественного новообразования практически у всех пациентов уже есть множественные микрометастазы [2]. При определенных условиях происходит переход единичной опухолевой клетки, находящейся в dormantном состоянии, в клетку, подобную стволовой, и начинается рост вторичного опухолевого узла – макрометастаза. Целью данной работы являлось моделирование перехода микрометастаза рака молочной железы в макрометастаз в гетероклеточных сфероидсах, состоящих из клеток печени человека, фибробластов, M0-макрофагов. Преимуществом разрабатываемой модели, включающей несколько типов клеток, является возможность учитывать межклеточные взаимодействия, что позволит повысить эффективность *in vitro* тестирования противоопухолевых иммунотерапевтических и генотерапевтических препаратов.

Материалы и методы

Для моделирования dormantных опухолевых клеток методом флуоресцентно-активированного сортинга выделяли популяцию CD44⁺ дифференцированных клеток генетически-модифицированной клеточной линии T47D, экспрессирующей красный флуоресцентный белок RFP (T47D_Red). Для получения гетеросфероидов печени использовали клетки гепатомы человека линии HepG2, иммортализованные фибробласты человека линии BJ-5ta, M0-макрофаги, дифференцированные из моноцитов периферической крови здоровых доноров, и CD44⁺ клетки линии рака молочной железы человека T47D_Red. Суспензию смеси клеток рассаживали в 81-луночные формы, предварительно изготовленные из 2%-ной агарозы с использованием силиконовых форм «MicroTissues Inc.» (США). Для индукции дедифференцировки опухолевых клеток в часть лунок добавляли интерлейкин 6 (IL6) в конечной концентрации 50 нг/мл. Для оценки динамики пролиферации опухолевых клеток T47D_Red на 1, 2, 3, 5 и 7-е сутки гетеросфероиды анализировали с использованием сканирующего флуоресцентного микроскопа Leica DMI8 (Германия). Жизнеспособность клеток в составе гетеросфероидов подтверждали на 7-е сутки культивирования путем окрашивания витальным красителем Calcein AM.

Результаты исследования и обсуждение

Использование суспензии клеток HepG2, BJ-5ta, M0-макрофагов, T47D_Red, смешанных в соотношении 15:1:1:1 в среде DMEM/F12 с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки, L-глутамин, антибиотика-антимикотика, приводило к формированию гетеросфероидов, содержащих единичные опухолевые клетки (рис. 1, а–е). Структура гетеросфероидов уплотнялась к 5-м суткам культивирования, и они приобретали

более четкие и ровные края. При добавлении IL6 с увеличением продолжительности инкубации наблюдали увеличение количества клеток рака молочной железы в составе гетеросфероидов, что свидетельствовало о дедифференцировке CD44⁺ клеток T47D_Red под действием цитокина-индуктора и их пролиферации с образованием вторичных опухолевых очагов (рис. 1, g–j) к 5-м суткам культивирования. Последующая оценка площади данных очагов может быть использована для сравнительного анализа эффективности противометастатических препаратов. Важно отметить, что клетки в составе гетеросфероидов сохраняли свою жизнеспособность в течение 7 суток культивирования (рис. 1, f, k).

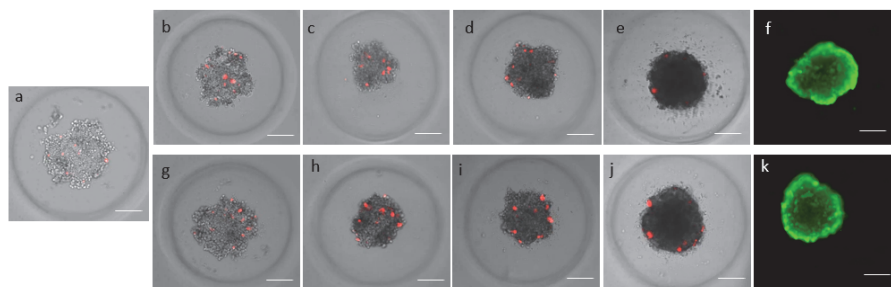


Рис. 1. Пролиферативная активность опухолевых клеток линии T47D_Red в составе гетеросфероидов печени: *a* – гетеросфероид через 1 ч инкубации, *b, c, d, e* – гетеросфероид через 24, 48, 72, 120 часов инкубации соответственно, *g, h, i, j* – гетеросфероид при добавлении IL6 через 24, 48, 72, 120 часов инкубации соответственно, *f* – жизнеспособность клеток, входящих в состав гетеросфероидов на 7-е сутки культивирования без и *k* – при добавлении IL6 (окраска Calcein AM).

Масштабная линейка: 100 мкм

[Fig. 1. Proliferation of T47D_Red cells in liver heterospheroid. *a* - 1h of incubation, *b, c, d, e* - 24, 48, 72, 120h of incubation respectively, *g, h, i, j* - 24, 48, 72, 120h of incubation with IL6 respectively, *f* - the cells viability in heterospheroid without and with IL6 at 7th day of incubation (Calcein AM staining). Scale bar: 100 μm]

Печень является наиболее распространенным местом метастазирования рака. Так, метастазы рака молочной железы в печень встречаются у 50–70% пациентов, у которых диагностирован вторичный рак молочной железы. Тем не менее существующие модели, воспроизводящие микроокружение печени и колонизации раковыми клетками, крайне ограничены [3]. В литературе описано несколько гетероклеточных 3D-моделей метастазов, например в кости [4, 5]. В этих работах клетки костной ткани и раковые клетки смешивали в различных соотношениях (1:1 или 9:1), что обусловлено, с одной стороны, необходимостью сформировать опухолевый узел достаточных размеров, а с другой – избежать избыточной пролиферации опухолевых клеток и образования зоны гипоксии. В статье Skardal et al. описана модель метастаза рака толстой кишки в печень, в данной работе для формирования органоида использовали всего два типа клеток: клетки HepG2 и клетки рака толстой кишки HCT-116, смешивая их в соотношении 10:1 [6]. Задачей настоящего исследования являлось создание модели самого раннего этапа

формирования вторичного опухолевого узла, а именно перехода дормантной опухолевой клетки в активно пролиферирующую. В связи с этим долю клеток рака молочной железы в составе гетеросфероида значительно уменьшили (17:1). Модель такого типа высоко востребована для тестирования препаратов, направленных на этап метастатического каскада, ассоциированный с дормантностью опухолевых клеток, и вызывающих, например, ингибирование аутофагии при нахождении клеток в дормантном состоянии, пролонгацию дормантного состояния [7] или блокирование дедифференцировки [8]. Преимущество использования гетероклеточных систем для тестирования подобного рода лекарственных препаратов заключается в том, что позволяет оценивать эффективность терапии с учетом влияния клеток микроокружения, включая фибробласты и иммунные клетки (особенно макрофаги) [9, 10]. Эти клетки характеризуются переменчивым фенотипом (т.е. способны быть перепрограммированы) и секретируют широкий спектр регуляторных молекул, которые имеют решающее значение для прогрессирования рака. Существующие простые модели опухолевых сфероидов [11] не позволяют учитывать вклад межклеточных взаимодействий.

Заключение

Таким образом, нами предложена модель микрометастазов рака молочной железы в печень на основе гетероклеточных сфероидов, которая предназначена для повышения эффективности скрининга противоопухолевых (антиметастатических), в том числе иммунных и генотерапевтических препаратов, за счет более точного воспроизведения микроокружения раковой клетки. Дальнейшие исследования позволят оценить релевантность полученной модели на основании анализа метаболомного и экспрессионного профиля органоида.

Список источников

1. Litviakov N., Ibragimova M., Tsyganov M., Kazantseva P., Deryusheva I., Pevzner A., Doroshenko A., Garbukov E., Tarabanovskaya N., Slonimskaya E.. Amplifications of stemness genes and the capacity of breast tumors for metastasis // *Oncotarget*. 2020. Vol. 11, № 21, PP. 1988–2001. doi: 10.18632/oncotarget.27608
2. Ramamoorthi G., Kodumudi K., Gallen C., Zachariah N.N., Basu A., Albert G., Beyer A., Snyder C., Wiener D., Costa R.L.B., Czerniecki B.J. Disseminated cancer cells in breast cancer: Mechanism of dissemination and dormancy and emerging insights on therapeutic opportunities // *Seminars in cancer biology*. 2022. Vol. 78. PP. 78–89. doi: 10.1016/j.semcancer.2021.02.004
3. Nuckhir M., Withey D., Cabral S., Harrison H., Clarke R.B. State of the Art Modelling of the Breast Cancer Metastatic Microenvironment: Where Are We? // *J. Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2024. Vol. 29, № 1. 14. doi: 10.1007/s10911-024-09567-z
4. Suurmond C.E., Leeuwenburgh S.C.G., van den Beucken J.J.J.P. Modelling bone metastasis in spheroids to study cancer progression and screen cisplatin efficacy // *Cell Prolif*. 2024. Vol. 57, № 9. e13693. doi: 10.1111/cpr.13693
5. Kumar V., Naqvi S.M., Verbruggen A., McEvoy E., McNamara L.M. A mechanobiological model of bone metastasis reveals that mechanical stimulation inhibits the pro-osteolytic effects of breast cancer cells // *Cell Rep*. 2024. Vol. 43, № 5. 114043. doi: 10.1016/j.celrep.2024.114043

6. Skardal A., Devarasetty M., Rodman C., Atala A., Soker S. Liver-Tumor Hybrid Organoids for Modeling Tumor Growth and Drug Response In Vitro // *Ann Biomed Eng.* 2015. Vol. 43, № 10. PP. 2361–2373. doi: 10.1007/s10439-015-1298-3
7. Ren D., Dai Y., Yang Q., Zhang X., Guo W., Ye L., Huang S., Chen X., Lai Y., Du H., Lin C., Peng X., Song L. Wnt5a induces and maintains prostate cancer cells dormancy in bone // *J Exp Med.* 2019. Vol. 216, № 2. PP. 428–449. doi: 10.1084/jem.20180661
8. Nevskaya K.V., Pershina A.G., Hmelevskaya E.S., Efimova L.V., Ibragimova M.K., Dolgasheva D.S., Tsydenova I.A., Ufandeev A.A., Buyko E.E., Perina E.A., Gaptulbarova K.A., Kravtsova E.A., Krivoshchekov S.V., Ivanov V.V., Guriev A.M., Udut E.V., Litviakov N.V. Prevention of Metastasis by Suppression of Stemness Genes Using a Combination of microRNAs // *J. Med Chem.* 2024. Vol. 67, № 7. PP. 5591–5602. doi: 10.1021/acs.jmedchem.3c02199
9. Rodrigues J., Heinrich M.A., Teixeira L.M., Prakash J. 3D In Vitro Model (R)evolution: Unveiling Tumor-Stroma Interactions // *Trends Cancer.* 2021. Vol. 7, № 3. PP. 249–264. doi: 10.1016/j.trecan.2020.10.009
10. Yakavets I., Francois A., Benoit A., Merlin J.L., Bezdetnaya L., Vogin G. Advanced co-culture 3D breast cancer model for investigation of fibrosis induced by external stimuli: optimization study // *Sci Rep.* 2020. Vol. 10. 21273. doi: 10.1038/s41598-020-78087-7
11. Xie G., Yao Q., Liu Y., Du S., Liu A., Guo Z., Sun A., Ruan J., Chen L., Ye C., Yuan Y. IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition promotes the generation of breast cancer stem-like cells analogous to mammosphere cultures // *Int J. Oncol.* 2012. Vol. 40, № 4. PP. 1171–1179. doi: 10.3892/ijo.2011.1275

References

1. Litviakov N, Ibragimova M, Tsyganov M, Kazantseva P, Deryusheva I, Pevzner A, Doroshenko A, Garbukov E, Tarabanovskaya N, Slonimskaya E. Amplifications of stemness genes and the capacity of breast tumors for metastasis. *Oncotarget.* 2020;11(21):1988-2001. doi: 10.18632/oncotarget.27608
2. Ramamoorthi G, Kodumudi K, Gallen C, Zachariah NN, Basu A, Albert G, Beyer A, Snyder C, Wiener D, Costa RLB, Czerniecki BJ. Disseminated cancer cells in breast cancer: Mechanism of dissemination and dormancy and emerging insights on therapeutic opportunities. *Seminars in cancer biology.* 2022;78:78-89. doi: 10.1016/j.semcancer.2021.02.004
3. Nuckhir M, Withey D., Cabral S., Harrison H, Clarke RB. State of the Art Modelling of the Breast Cancer Metastatic Microenvironment: Where Are We? *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2024;29(1):14. doi: 10.1007/s10911-024-09567-z
4. Suurmond CE, Leeuwenburgh SCG, van den Beucken JJJP. Modelling bone metastasis in spheroids to study cancer progression and screen cisplatin efficacy. *Cell Prolif.* 2024;57(9):e13693. doi: 10.1111/cpr.13693
5. Kumar V, Naqvi SM, Verbruggen A, McEvoy E, McNamara LM. A mechanobiological model of bone metastasis reveals that mechanical stimulation inhibits the pro-osteolytic effects of breast cancer cells. *Cell Rep.* 2024;43(5):114043. doi: 10.1016/j.celrep.2024.114043
6. Skardal A, Devarasetty M, Rodman C, Atala A, Soker S. Liver-Tumor Hybrid Organoids for Modeling Tumor Growth and Drug Response In Vitro. *Ann Biomed Eng.* 2015;43(10):2361-2373. doi: 10.1007/s10439-015-1298-3
7. Ren D, Dai Y, Yang Q, Zhang X, Guo W, Ye L, Huang S, Chen X, Lai Y, Du H, Lin C, Peng X, Song L. Wnt5a induces and maintains prostate cancer cells dormancy in bone. *J Exp Med.* 2019;216(2):428-449. doi: 10.1084/jem.20180661
8. Nevskaya KV, Pershina AG, Hmelevskaya ES, Efimova LV, Ibragimova MK, Dolgasheva DS, Tsydenova IA, Ufandeev AA, Buyko EE, Perina EA, Gaptulbarova KA, Kravtsova EA, Krivoshchekov SV, Ivanov VV, Guriev AM, Udut EV, Litviakov NV. Prevention of Metastasis by Suppression of Stemness Genes Using a Combination of microRNAs. *J Med Chem.* 2024;67(7):5591-5602. doi: 10.1021/acs.jmedchem.3c02199

9. Rodrigues J, Heinrich MA, Teixeira LM, Prakash J. 3D In Vitro Model (R)evolution: Unveiling Tumor-Stroma Interactions. *Trends Cancer*. 2021;7(3):249-264. doi: 10.1016/j.trecan.2020.10.009
10. Yakavets I, Francois A, Benoit A, Merlin JL, Bezdetnaya L, Vogin G. Advanced co-culture 3D breast cancer model for investigation of fibrosis induced by external stimuli: optimization study. *Sci Rep*. 2020;10:21273. doi: 10.1038/s41598-020-78087-7
11. Xie G, Yao Q, Liu Y, Du S, Liu A, Guo Z, Sun A, Ruan J, Chen L, Ye C, Yuan Y. IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition promotes the generation of breast cancer stem-like cells analogous to mammosphere cultures. *Int J Oncol*. 2012;40(4):1171-1179. doi: 10.3892/ijo.2011.1275

Информация об авторах:

Невская Ксения Владимировна, канд. мед. наук, н.с. Центра биологических исследований и биоинженерии Сибирского государственного медицинского университета (Томск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1659-8812>

E-mail: Nevskayaksenia@gmail.com

Ефимова Лина Викторовна, м.н.с. Центра биологических исследований и биоинженерии Сибирского государственного медицинского университета (Томск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7168-1419>

E-mail: efimova.lina@gmail.com

Козлова Полина Константиновна, лаборант-исследователь Центра биологических исследований и биоинженерии Сибирского государственного медицинского университета (Томск, Россия).

E-mail: kozlovapolina13@mail.ru

Першина Александра Геннадьевна, канд. биол. наук, зав. Центром биологических исследований и биоинженерии Сибирского государственного медицинского университета (Томск, Россия).

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7604-9722>

E-mail: allysyz@mail.ru

Удуд Елена Владимировна, д-р мед. наук, профессор, зав. Центральной научно-исследовательской лаборатории Сибирского государственного медицинского университета (Томск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6104-4782>

E-mail: udut.ev@ssmu.ru

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Information about the authors:

Kseniya V. Nevskaya, Cand.Sci. (Med.), researcher of the Center of Bioscience and Bioengineering, Siberian State Medical University (Tomsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1659-8812>

E-mail: nevskayaksenia@gmail.com

Lina V. Efimova, junior researcher of the Center of Bioscience and Bioengineering, Siberian State Medical University (Tomsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7168-1419>

E-mail: efimova.lina@gmail.com

Polina K. Kozlova, laboratory research assistant of the Center of Bioscience and Bioengineering, Siberian State Medical University (Tomsk, Russian Federation).

E-mail: kozlovapolina13@mail.ru

Alexandra G. Pershina, Cand.Sci. (Biol.), head of the Center of Bioscience and Bioengineering, Siberian State Medical University (Tomsk, Russian Federation).

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7604-9722>

E-mail: allysyz@mail.ru

Elena V. Udut, Doc.Sci. (Med.), professor, head of the Central Research Laboratory, Siberian State Medical University (Tomsk, Russian Federation).
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6104-4782>
E-mail: udut.ev@ssmu.ru

The Authors declare no conflict of interest.

*Статья поступила в редакцию 25.08.2024;
одобрена после рецензирования 05.11.2024; принята к публикации 03.03.2025.*

*The article was submitted 25.08.2024;
approved after reviewing 05.11.2024; accepted for publication 03.03.2025.*

Научная статья

УДК 579.64

doi: 10.17223/19988591/69/15

Метаболическая активность гетеротрофных микробных сообществ пойменных озёр среднего течения реки Оби

Эллина Георгиевна Никиткина¹, Инна Владимировна Луцаева²,
Лариса Геннадьевна Колесниченко³

^{1, 2, 3} *Национальный исследовательский Томский государственный университет,
Томск, Россия*

¹ <https://orcid.org/0009-0005-6618-4644>, madderroot@mail.ru

² <https://orcid.org/0000-0002-7874-4558>, luschaeva@mail.ru

³ <https://orcid.org/0000-0001-9797-8985>, klg7777@mail.ru

Аннотация. Оценка функционального разнообразия – актуальный в экологии микроорганизмов и достаточно чувствительный способ обнаружения биологически важных закономерностей в жизнедеятельности микробных сообществ. Изучение функционального разнообразия с помощью метода мультисубстратного тестирования и оценка его взаимосвязей с количественными микробиологическими характеристиками в контексте сезонных изменений были выполнены для гетеротрофных микробных сообществ поверхностного и придонного слоя водной толщи трёх озёр среднеобской поймы, а также воды потока самой реки Оби в период летней межени, зимней межени (ледостав) и весеннего половодья (паводок). Сезонные изменения функциональных и количественных микробиологических показателей в пойменных водоёмах характеризовали сезонную сукцессию микробного сообщества. Полученные результаты говорят о космополитичности и функциональной взаимозамещаемости представителей природных микробных сообществ. Данное исследование обеспечивает возможность количественно оценить биогенную составляющую баланса углерода, её динамику и взаимосвязь с экологическими факторами.

Ключевые слова: гетеротрофные микроорганизмы, функциональное разнообразие, мультисубстратное тестирование, пойменное озеро, пойма реки Оби, Западная Сибирь

Источник финансирования: исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № FSWM-2023-0005 – полевые исследования, отбор проб, проект № FSWM-2020-0019 – лабораторные исследования, камеральная обработка материалов).

Благодарности: коллективу УНУ «Система экспериментальных баз, расположенных вдоль широтного градиента» за помощь в организации и проведении полевых работ.

Для цитирования: Никиткина Э.Г., Луцаева И.В., Колесниченко Л.Г. Метаболическая активность гетеротрофных микробных сообществ пойменных озёр среднего течения реки Оби // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2025. № 69. С. 130–138. doi: 10.17223/19988591/69/15

Metabolic activity of heterotrophic microbial communities of floodplain lakes in the middle reaches of the Ob River

Ellina G. Nikitkina¹, Inna V. Luschaeva², Larisa G. Kolesnichenko³

^{1, 2, 3} Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

¹ <https://orcid.org/0009-0005-6618-4644>, madderroot@mail.ru

² <https://orcid.org/0000-0002-7874-4558>, luschaeva@mail.ru

³ <https://orcid.org/0000-0001-9797-8985>, klg7777@mail.ru

Summary. This study provides an opportunity to quantify the biogenic component of the carbon balance, its dynamics and relationship with environmental factors. This study is the first to evaluate the functioning of microbial communities in floodplain lakes in the middle reaches of the Ob River from the perspective of studying their metabolic activity in the context of seasonal and spatial environmental changes. The purpose of this work was to assess seasonal changes in the metabolic spectra of bacterial communities in water bodies of the Middle Ob floodplain. During the summer low water period (September 2023), winter low water period (snow period, March 2024) and spring flood (May 2024), functional diversity and quantitative microbiological characteristics of heterotrophic microbial communities in the surface and bottom layers of the water column of three floodplain lakes located in the vicinity of the TSU research station “Kaibasovo” (N 57.24569342272839, E 84.18459154598635), as well as the water of the Ob River itself, were studied. Functional diversity was determined using the multisubstrate testing method on 96-well Biolog Ecoplate test systems (USA) with calculation of the AWCD (average well-covered development) index. The TMC (total microbial count), obtained by direct counting of bacterial cells in a fluorescent-stained sample, was used as a quantitative characteristic. According to the nonparametric analysis of variance (Kruskal-Wallis ANOVA test, Median test), AWCD and TMC did not differ between lakes ($p > 0.05$). Seasonal changes were revealed for AWCD and TMC (see Fig. 1). AWCD correlated (Spearman rank correlations were used, $p < 0.05$) with the consumption of amino acids (0.52), carbohydrates (0.54), amines (0.50) and oxycarboxylic acids (0.62), TMC correlated with the consumption of carbohydrates (0.45) and polymers (0.63). The dynamics of AWCD were similar for the surface layer of all lakes, and did not show obvious patterns in the bottom layer. Throughout the year, higher TMC values were observed in the bottom layer, although this pattern was not observed for AWCD (see Fig. 1). This is due to the effect of ultraviolet radiation from the sun and the influence of allochthonous microflora on the current AWCD values. TMC in floodplain lakes increased during winter low water and had minimum values during the flood period. During the winter low water period, the AWCD and the consumption of most substrate groups are higher in the bottom layer. Seasonal differences in consumption of carboxylic acid phosphates (Kruskal-Wallis test: $H(2, N = 18) = 10.36$; $p = 0.01$; Median test: Chi-Square = 12.00; $df = 2$; $p = 0.00$) and polymers (Kruskal-Wallis test: $H(2, N = 18) = 7.18$; $p = 0.03$; Median test: Chi-Square = 9.33; $df = 2$; $p = 0.01$) have been identified (see Fig. 2). A large number of correlations between the consumption of different groups of substrates, including within the surface and bottom layers, indicate the cosmopolitan nature and functional interchangeability of representatives of microbial communities. Moreover, during low water, when conditions are most favorable for the growth of microflora, the number of correlations was maximum (9 out of 15); during the freeze-up period it decreased significantly (4 out of 15), which may indicate a targeted growth of more specialized microflora. In May, the number of correlations

increased again (5 out of 15). Seasonal changes in the functional and quantitative characteristics of microbial communities did not correspond to each other - the increase in the number of microorganisms did not cause an increase in functional diversity. The microflora suppression during flooding characterizes the demi-seasonal succession of the microbial community. Based on the data obtained, one can judge the functional cosmopolitanism and functional interchangeability of representatives of microbial communities of floodplain water bodies.

The article contains 2 Figures, 12 References.

Keywords: heterotrophic microorganisms; functional diversity, multisubstrate test, fluvial lake, Ob river floodplain, West Siberia

Fundings: This work was performed within the framework of a state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project No. FSWM-2023-0005 - field research, sampling, project No. FSWM-2020-0019 - laboratory research, office processing of materials).

Acknowledgments: To the team of the USI "System of Experimental Bases Located Along the Latitudinal Gradient" for assistance in organizing and conducting field work.

For citation: Nikitkina EG, Luschaeva IV, Kolesnichenko LG. Metabolic activity of heterotrophic microbial communities of floodplain lakes in the middle reaches of the Ob River. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2025;69:130-138. doi: 10.17223/19988591/69/15

Введение

Исследование микробиологической трансформации органического вещества в пойменных экосистемах Сибири имеет большое значение, так как дает возможность количественно оценить биогенную составляющую баланса углерода, её динамику и взаимосвязь с экологическими и антропогенными факторами. Оценка функционального разнообразия является достаточно чувствительным, а потому актуальным в экологии микроорганизмов альтернативным подходом в изучении биоразнообразия и обнаружении биологически важных закономерностей в жизнедеятельности микробных сообществ [1]. Одним из наиболее востребованных способов оценки функционального разнообразия считается метод мультисубстратного тестирования, основанный на спектрофотометрическом определении интенсивности потребления углеродсодержащих субстратов микробными сообществами [2, 3]. Мультисубстратное тестирование успешно применяется в интересах почвенной микробиологии, однако в последнее время растёт популярность этого метода в исследованиях водных микробиоценозов [4–7]. В представленном исследовании впервые оценено функционирование микробных сообществ пойменных озёр среднего течения реки Оби с позиции изучения их метаболической активности в контексте сезонных и пространственных изменений окружающей среды. Цель настоящей работы – оценка сезонного изменения метаболических спектров бактериальных сообществ водоёмов среднеобской поймы. Изучение функционального разнообразия и количественных микробиологических характеристик было выполнено для гетеротрофных микробных сообществ поверхностного и придонного слоя водной

толщи трёх пойменных озёр, а также воды потока самой р. Оби в период летней межени, зимней межени (ледостав) и весеннего половодья (паводок).

Материалы и методы

В качестве объекта исследования использованы образцы воды трёх типичных озёр центральной поймы среднего течения реки Оби, расположенных в окрестностях исследовательской станции ТГУ «Кайбасово» [8], отобранные в сентябре 2023 (межень), марте 2024 (ледостав) и мае 2024 г. (паводок) с поверхностного и придонного слоя водной толщи. Подсчёт общего числа микроорганизмов (ОМЧ) осуществляли посредством окрашивания препаратов флуоресцентным двухкомпонентным красителем L7012 (LIVE/DEAD BacLight bacterial viability kit®) в соответствии с рекомендациями производителя с последующим подсчётом клеток согласно протоколу изготовителя с использованием люминесцентного микроскопа «Zeiss» Axio Imager Z2 (Германия). Оценку метаболической активности микроорганизмов осуществляли по методу мультисубстратного тестирования с помощью тест-системы «Biolog» Ecoplate (США). Планшеты инкубировали в термостате при 28°C 72 ч до проявления визуальной регистрируемой окраски ячеек. Изменение окраски в каждой лунке измеряли как показатель оптической плотности при 510 нм с использованием микропланшетного фотометра Multiscan FC («Thermo Scientific», China).

Для статистического анализа полученных данных использовались непараметрические методы. Для проверки распределений на нормальность применяли критерий Шапиро–Уилка для $p < 0,05$, для проверки соответствия выборок – критерий Kruskal–Wallis ANOVA для $p < 0,05$, значимые корреляции выявляли по критерию Спирмена при $p < 0,05$. В качестве качественного показателя функционального разнообразия микробоценоза применяли индекс AWCD (average well-covered development), который рассчитывали по изменению оптической плотности потребляемого субстрата в ячейках [3]. Статистические расчёты и графическую визуализацию осуществляли с использованием пакетов ПО Statistica 6.4 и MS Excel 2021.

Результаты исследования и обсуждение

Не выявлено статистически значимых отличий AWCD и ОМЧ для вод разных озёр ($p > 0,05$). Сезонные изменения для AWCD и ОМЧ представлены на рис. 1.

Индекс AWCD коррелировал по Спирмену с потреблением аминокислот (0,52; $p < 0,05$), углеводов (0,54; $p < 0,05$), аминов (0,50; $p < 0,05$) и оксикарбоновых кислот (0,62; $p < 0,05$), ОМЧ коррелировало с интенсивностью потребления углеводов (0,45; $p < 0,05$) и полимеров (0,63; $p < 0,05$).

Динамика значений показателя AWCD была сходна для поверхностного слоя всех озёр и не демонстрировала явных закономерностей в придонном. В течение всего года отмечались более высокие значения ОМЧ в придонном слое при том, что для AWCD эта закономерность не работала. Это связано с

тем, что воды придонного слоя более богаты питательными веществами, а размножение бактерий в поверхностных слоях подавляется солнечным ультрафиолетом.

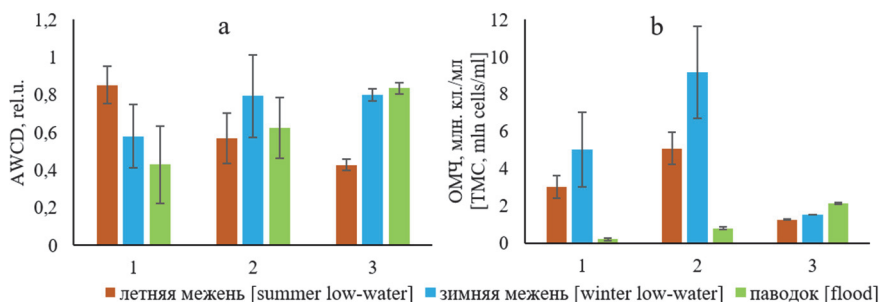


Рис. 1. Функциональное разнообразие и общая бактериальная обсеменённость водоёмов поймы Средней Оби: *a* – значения индекса функционального разнообразия AWCD (average well-covered development), *b* – показатель ОМЧ (общее микробное S-число), выраженное в млн клеток в 1 мл воды (1 – поверхностный слой озёр, 2 – придонный слой озёр, 3 – река Обь)

[Fig. 1. Functional diversity and total bacterial count in water reservoirs of middle Ob floodplain: *a* - values of the AWCD (average well-covered development) functional diversity index, *b* - TBC (total bacterial count) index, expressed in million cells in 1 ml of water (1 - surface layer of lakes, 2 - bottom layer of lakes, 3 - Ob River)]

ОМЧ в пойменных озёрах увеличивалось в зимнюю межень и имело минимальные значения в период паводка. Сравнивая полученные результаты со значениями индекса разнообразия AWCD, можно предполагать, что стабилизация условий зимой обеспечивает экспансию и интенсивный рост функционально компетентных микроорганизмов из придонных слоёв, так как именно в этом слое в зимнюю межень выше индекс AWCD и интенсивность употребления большинства групп субстратов.

В паводковый период ОМЧ было низким как в верхних, так и в нижних слоях (хотя в нижних достоверно выше, так как процессы паводкового перемешивания меньше влияют на состояние придонных слоёв). Снижение функционального разнообразия при паводке проявляется только в виде тенденции – вероятно, из-за привнесения аллохтонной микрофлоры, которая влияет на показатель функционального разнообразия, но не способна интенсивно размножаться и оказывать влияние на текущие количественные показатели. По всей видимости, в это время происходит сезонная сукцессия микробного сообщества.

В Оби показатели ОМЧ стабильно невысокие и обладают низкой сезонной изменчивостью (Kruskal–Wallis test: $H(2, N=3) = 2,00, p = 0,37$; Median test: Chi-Square = 3,00, $df = 2, p = 0,22$), что свойственно для текущих водоёмов. Индекс AWCD вырос в зимнюю межень, но в отличие от озёр продемонстрировал значительный скачок в период паводка, что можно связать с привнесением в поверхностные слои потока аллохтонной микрофлоры береговых смылов.

Для удобства оценки функциональной активности микробных сообществ органические субстраты были объединены в функциональные группы, в пределах которых оценивалась реакция сообществ [2, 7, 9].

По критерию Краскела–Уоллиса в разных озёрах сходно потребление всех субстратов, кроме оксикарбоновых кислот (Kruskal–Wallis test: $H(2, N = 18) = 6,17, p = 0,05$; Median test: Chi-Square = 4,00 $df = 2, p = 0,14$). Значимого влияния фактора глубины пробоотбора на потребление групп субстратов также выявлено не было. По этому же критерию выявлены сезонные отличия в потреблении фосфатов карбоновых кислот (Kruskal–Wallis test: $H(2, N = 18) = 10,36, p = 0,01$; Median test: Chi-Square = 12,00, $df = 2, p < 0,01$) и полимеров (Kruskal–Wallis test: $H(2, N = 18) = 7,18, p = 0,03$; Median test: Chi-Square = 9,33, $df = 2, p = 0,01$).

Сезонная динамика потребления функциональных групп субстратов представлена на рис. 2.

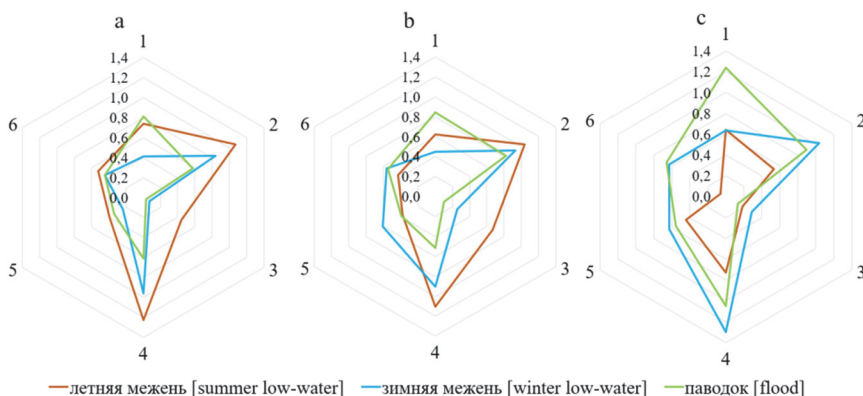


Рис. 2. Интенсивность употребления (по индексу развития цвета в ячейке AWCD) групп субстратов микробным сообществом пойменных водоёмов: *a* – поверхностный слой озёр, *b* – придонный слой озёр, *c* – река Обь (1 – аминокислоты, 2 – углеводы, 3 – фосфаты карбоновых кислот, 4 – полимеры, 5 – амины, 6 – оксикарбоновые кислоты)

[Fig. 2. Consumption (according to the AWCD index - average well-covered development) of substrate groups by the microbial community of floodplain water bodies: *a* - surface layer of lakes, *b* - bottom layer of lakes, *c* - Ob River (1 - amino acids, 2 - carbohydrates, 3 - phosphates of carboxylic acids, 4 - polymers, 5 - amines, 6 - oxycarboxylic acids)]

Наблюдаемая динамика может быть связана с газовым режимом водоёма: истощение запаса растворённого кислорода в снеговой период способствует использованию углеводов, а не аминокислот [7]. По всей видимости, в зимнюю межень начинают использоваться именно запасы фиксированного в углеводах углерода [7, 9, 10], а запасы аминокислот истощаются с отмиранием водорослей [11, 12], что способствует большей выживаемости компетентных микроорганизмов либо смене ферментативной стратегии бактерий-космополитов. В период снеготаяния и паводка снова начинают активно употребляться аминокислоты, а потребление углеводов и полимеров снижается, вероятно, из-за истощения субстрата и разбавления талыми водами [7].

Динамика потребления фосфатов карбоновых кислот указывает на экспансию микробиоты нижних слоёв вверх из-за обмеления водоёма в летнюю межень.

В воде р. Оби динамика употребления функциональных групп субстратов была совершенно иной.

Наблюдалась мультиколлинеарность показателей интенсивности потребления различных групп субстратов, в том числе и в пределах поверхностного и придонного слоёв, что говорит о космополитичности и функциональной взаимозамещаемости представителей природных микробных сообществ. При этом в межень, когда условия наиболее благоприятны для роста микрофлоры, мультиколлинеарность была максимальной (наблюдались корреляции для 9 пар субстратов из 15 возможных), а в период ледостава она значительно снизилась (4 из 15), что может свидетельствовать о точечном росте более специализированной микрофлоры. В мае число корреляций снова возрастало (5 из 15).

Заключение

Исследованные озёра поймы р. Оби не отличались друг от друга по численности микроорганизмов и функциональному разнообразию. Определено сезонное влияние пойменного режима на функциональные характеристики микроорганизмов пойменных водоёмов. Сезонные изменения функциональных и количественных характеристик микробоценозов друг другу не соответствовали – рост числа микроорганизмов не обуславливал увеличение функционального разнообразия. Динамика функциональных и количественных характеристик микробных сообществ в р. Оби отличалась от таковой в озёрах поймы. При этом динамика показателя функционального разнообразия и общего числа микроорганизмов для Оби имели сходный друг с другом характер. В летнюю межень функциональное разнообразие в поверхностных слоях выше, чем в придонных, а численность микроорганизмов, напротив, ниже. В период зимней межени, когда микробные сообщества функционируют в стабильных, но необычных подлёдных условиях, более активно развивается узкоспециализированная микробиота придонных слоёв. В период паводка деятельность микробных сообществ в озёрах сильно угнетена: разбавление тальми водами, изменение газовых условий, истощение органического субстрата приводят к сильному снижению общего числа микроорганизмов. Угнетение микрофлоры при паводке характеризует демисезонную сукцессию микробного сообщества. Мультиколлинеарность показателей интенсивности потребления групп субстратов между собой указывает на функциональную универсальность представителей пойменных микробных сообществ.

Список источников

1. Baldrian P. The known and the unknown in soil microbial ecology // *FEMS Microbiology Ecology*. 2019. Vol. 95, № 2. PP. 1–9. doi: 10.1093/femsec/fiz005
2. Zak J.C., Willig M.R., Moorhead D.L., Wildman H.G. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach // *Soil Biology and Biochemistry*. 1994. Vol. 26, № 9. PP. 1101–1108. doi: 10.1016/0038-0717(94)90131-7
3. Garland J., Mills A. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization // *Applied and environmental microbiology*. 1991. Vol. 57, № 8. PP. 1–9. doi: 10.1128/aem.57.8.2351-2359.1991

4. Wang M., Fan Z., Wang R., Liu Z., Gao F., Zhang Z., Yi M., Lu M. Nitrogen removal performance, and microbial community structure of water and its association with nitrogen metabolism of an ecological engineering pond aquaculture system // *Aquaculture Reports*. 2022. Vol. 25. PP. 1–9. doi: 10.1016/j.aqrep.2022.101258
5. Miao L., Wang C., Adyel T.M., Wu J., Liu Z., You G., Meng M., Qu H., Huang L., Yu Y., Hou J. Microbial carbon metabolic functions of biofilms on plastic debris influenced by the substrate types and environmental factors // *Environment International*. 2020. Vol. 143. PP. 1–11. doi: 10.1016/j.envint.2020.106007.
6. Беленева И.А., Харченко У.В. Применение метода мультисубстратного тестирования состояния морских поверхностных вод // *Биология моря*. 2018. Т. 44, № 3. С. 172–178.
7. Tiquia S.M. Metabolic diversity of the heterotrophic microorganisms and potential link to pollution of the Rouge River // *Environmental Pollution*. 2010. Vol. 158, № 5. PP. 1435–1443. doi: 10.1016/j.envpol.2009.12.035
8. Kolesnichenko L.G., Lyutova E.S., Vorobiov S.N., Prokushkin A.S., Raudina T.V., Kolesnichenko Y.Y., Rozhkova-Timina I.O., Yasnova A.S., Pokrovsky O.S. Organic matter of floodplain lakes in the middle courses of the Ob River during the winter low-water season and the spring flood // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2019. Vol. 400. PP. 1–9. doi: 10.1088/1755-1315/400/1/012007
9. Biddanda B., Benner R. Carbon, nitrogen, and carbohydrate fluxes during the production of particulate and dissolved organic matter by marine phytoplankton // *Limnology and Oceanography*. 1997. Vol. 42, № 3. PP. 506–518.
10. Grover J.P., Chrzanowski T.H. Seasonal patterns of substrate utilization by bacterioplankton: case studies in four temperate lakes of different latitudes // *Aquatic Microbial Ecology*. 2000. Vol. 23, № 1. PP. 41–54. doi: 10.3354/ame023041
11. Madigan M.T., Martinko K., Parker J. *Brock Biology of Microorganisms*, 8th ed. New Jersey: Prentice Hall International Inc., 1997. 1040 p.
12. Hellebust J.A. Excretion of some organic compounds by marine phytoplankton // *Limnology and Oceanography*. 1965. Vol. 10, № 2. PP. 192–206. doi: 10.4319/lo.1965.10.2.0192

References

1. Baldrian P. The known and the unknown in soil microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*. 2019;95(2):1-9. doi: 10.1093/femsec/fiz005
2. Zak JC, Willig MR, Moorhead DL, Wildman HG. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biology and Biochemistry*. 1994;26(9):1101-1108. doi: 10.1016/0038-0717(94)90131-7
3. Garland J, Mills A. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and environmental microbiology*. 1991;57(8):1-9. doi: 10.1128/aem.57.8.2351-2359.1991
4. Wang M, Fan Z, Wang R, Liu Z, Gao F, Zhang Z, Yi M, Lu M. Nitrogen removal performance, and microbial community structure of water and its association with nitrogen metabolism of an ecological engineering pond aquaculture system. *Aquaculture Reports*. 2022;25:1-9. doi: 10.1016/j.aqrep.2022.101258
5. Miao L, Wang C, Adyel TM, Wu J, Liu Z, You G, Meng M, Qu H, Huang L, Yu Y, Hou J. Microbial carbon metabolic functions of biofilms on plastic debris influenced by the substrate types and environmental factors. *Environment International*. 2020;143:1-11. doi: 10.1016/j.envint.2020.106007.
6. Beleneva IA, Charchenko UV. Primeneniye metoda multisubstratnogo testirovaniya sostoyaniya morskikh poverhnostnykh vod [Application of the multi-substrate testing method for the state of marine surface waters]. *Biologiya morya*. 2018;44(3):172-178. In Russian
7. Tiquia SM. Metabolic diversity of the heterotrophic microorganisms and potential link to pollution of the Rouge River. *Environmental Pollution*. 2010;158(5):1435-1443. doi: 10.1016/j.envpol.2009.12.035

8. Kolesnichenko LG, Lyutova ES, Vorobiov SN, Prokushkin AS, Raudina TV, Kolesnichenko YY, Rozhkova-Timina IO, Yasnova AS, Pokrovsky OS. Organic matter of floodplain lakes in the middle courses of the Ob River during the winter low-water season and the spring flood. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2019;400:1-9. doi: 10.1088/1755-1315/400/1/012007
9. Biddanda B, Benner R. Carbon, nitrogen, and carbohydrate fluxes during the production of particulate and dissolved organic matter by marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography*. 1997;42(3):506-518.
10. Grover JP, Chrzanowski TH. Seasonal patterns of substrate utilization by bacterioplankton: case studies in four temperate lakes of different latitudes. *Aquatic Microbial Ecology*. 2000;23(1):41-54. doi: 10.3354/ame023041
11. Madigan MT, Martinko K, Parker J. Brock Biology of Microorganisms, 8th ed. New Jersey: Prentice Hall International Inc.; 1997. 1040 p.
12. Hellebust JA. Excretion of some organic compounds by marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography*. 1965;10(2):192-206. doi: 10.4319/lo.1965.10.2.0192

Информация об авторах:

Никиткина Эллина Георгиевна, м.н.с. лаборатории биоразнообразия и экологии Томского государственного университета (Томск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-6618-4644>

E-mail: madderroot@mail.ru

Лушаева Инна Владимировна, доцент, канд. биол. наук, с.н.с. лаборатории биоразнообразия и экологии Томского государственного университета (Томск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7874-4558>

E-mail: luschaeva@mail.ru

Колесниченко Лариса Геннадьевна, доцент, канд. биол. наук, лаборатория биоразнообразия и экологии Томского государственного университета (Томск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9797-8985>

E-mail: klg7777@mail.ru

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Information about the authors:

Ellina G. Nikitkina, Junior researcher of the Laboratory of biodiversity and ecology, Tomsk State University (Tomsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-6618-4644>

E-mail: madderroot@mail.ru

Inna V. Luschaeva, Cand.Sci. (Biol.), Senior researcher of the Laboratory of biodiversity and ecology, Tomsk State University (Tomsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7874-4558>

E-mail: luschaeva@mail.ru

Larisa G. Kolesnichenko, Cand.Sci. (Biol.), Senior researcher of the Laboratory of biodiversity and ecology, Tomsk State University (Tomsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9797-8985>

E-mail: klg7777@mail.ru

The Authors declare no conflict of interest.

*Статья поступила в редакцию 24.08.2024;
одобрена после рецензирования 24.11.2024; принята к публикации 03.03.2025.*

*The article was submitted 24.08.2024;
approved after reviewing 24.11.2024; accepted for publication 03.03.2025.*

Научная статья
УДК 575.174:638.12
doi: 10.17223/19988591/69/16

Генетические исследования медоносной пчелы *Apis mellifera* L. в Томском государственном университете

Надежда Васильевна Островерхова¹

¹ Национальный исследовательский Томский государственный университет,
Томск, Россия

¹ <https://orcid.org/0000-0001-9837-4905>, nvostrov@mail.ru

Аннотация. Медоносная пчела *Apis mellifera* L. является одним из наиболее изучаемых видов насекомых во всем мире в связи с ее экологической и экономической значимостью. В Сибирь медоносная пчела завезена 240 лет назад; она хорошо адаптировалась к природно-климатическим условиям и растительности региона. Первые научные исследования медоносной пчелы проведены в Томском университете, открытом в 1888 г. В начале XX в. сотрудниками университета заложены научные основы пчеловодства, но систематические исследования медоносной пчелы, включая генетические, начались только спустя 100 лет. В научно-практическом центре «Апис» Томского государственного университета (ТГУ), созданном в 2004 г., проводятся исследования разных аспектов медоносной пчелы, включая оценку породного состава, генетического разнообразия, биологических и хозяйственных показателей пчелиных семей, зараженности болезнями, медоносной базы и др. В статье представлен краткий обзор научных исследований и достижений в области биологии и генетики медоносной пчелы, выполненных в ТГУ, а также перспектив их внедрения в практику пчеловодства и селекцию медоносной пчелы.

Ключевые слова: медоносная пчела, *Apis mellifera*, среднерусская порода, ДНК-маркеры, Сибирь

Для цитирования: Островерхова Н.В. Генетические исследования медоносной пчелы *Apis mellifera* L. в Томском государственном университете // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2025. № 69. С. 139–146. doi: 10.17223/19988591/69/16

Original article
doi: 10.17223/19988591/69/16

Genetic research of the honey bee *Apis mellifera* L. at Tomsk State University

Nadezhda V. Ostroverkhova¹

¹ Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

¹ <https://orcid.org/0000-0001-9837-4905>, nvostrov@mail.ru

Summary. The honey bee *Apis mellifera* L. is one of the most studied insect species worldwide due to its ecological and economic importance. The honey bee was introduced into Siberia 240 years ago. It has adapted well to local natural conditions and

vegetation. The first scientific research on the honey bee was carried out at Tomsk University, opened in 1888. Systematic research of the honey bee, including genetic studies, has been carried out at Tomsk University since 2004, when the scientific and practical center "Apis" was created. Various aspects of the honey bee are studied: biological and genetic diversity, biological and economic signs of colonies, morbidity, honey resources, etc. This article is a brief overview of scientific research and achievements in the biology and genetics of the honey bee, carried out at TSU, as well as the prospects for their implementation in beekeeping practice.

Morphometric and mtDNA analysis showed that most bee colonies are hybrids between the dark forest bee and the southern bee subspecies. In Siberia, there are populations of the dark forest bee (Ob and Yenisei populations). According to the analysis of mtDNA and microsatellite loci, Siberian populations are the *Apis mellifera mellifera* Siberian ecotype, which differs from the dark forest bee of the Ural and European populations. An assessment of the adaptive potential (ecological and genetic characteristics) of bee colonies of the Ob and Yenisei populations showed their high viability and productivity in different regions of Siberia. These colonies were the basis of the breeding core in the *A. m. mellifera* bee farm. When breeding dark forest bees, we use both classical selection methods and introduce molecular selection. We are the first to identify microsatellite markers that can be used to predict *Nosema* disease in the dark forest bee. To select *A. m. mellifera* colonies that are highly productive for royal jelly, we use the *mrjp3* microsatellite locus, localized within the gene encoding the main royal jelly proteins (marker-associated selection). Research conducted at Tomsk State University contributes to the preservation of Siberian populations and the gene pool of the dark forest bee, the development of the best signs of bee colonies through further selection and the creation of highly productive lines.

The article contains 19 References.

Keywords: honeybee, *Apis mellifera*, dark forest bee, DNA markers, Siberia

For citation: Ostroverkhova NV. Genetic research of the honey bee *Apis mellifera* L. at Tomsk State University. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya* = *Tomsk State University Journal of Biology*. 2025;69:139-146. doi: 10.17223/19988591/69/16

Введение

Медоносная пчела *Apis mellifera* L. завезена в Сибирь в 1786 г., но научные вопросы пчеловодства до начала XX в. практически не рассматривались. Первые научные исследования медоносной пчелы проведены учеными Томского университета и посвящены изучению медоносной базы пчел, оценке ряда показателей сибирского меда, а также разработке научных основ пчеловодства [1]. Систематические исследования биологии и генетики медоносной пчелы начались в Томском государственном университете (ТГУ) только в начале XXI в. [2–5], когда в ТГУ был создан научно-практический центр (НПЦ) «Апис». Основными направлениями центра являются оценка современного состояния популяций *A. mellifera* в Томской области, сохранение генофонда местных пчел и определение путей развития сибирского пчеловодства. Цель работы – краткий обзор исследований в области биологии и генетики медоносной пчелы, проводимых в ТГУ, а также описание научных достижений НПЦ «Апис» и перспектив их внедрения в практику пчеловодства и селекцию медоносной пчелы.

Исследование породности медоносной пчелы

В Сибири первоначально разводилась темная лесная пчела *Apis mellifera mellifera* L. (среднерусская порода, эволюционная линия М), которая хорошо приспособилась к местным природно-климатическим условиям и медоносной базе [1]. Первые случаи завоза в Сибирь других пород пчел описаны в 1920-х гг. С конца XX в. завоз коммерческих линий пчел южного происхождения (карпатских и краинских пчел, породы Бэкфаст и др.; эволюционная линия С), а часто пчел неизвестного происхождения, является массовым и практически неконтролируемым. Это привело к межпородной гибридизации пчел, уменьшению ареала темной лесной пчелы и потере ее чистопородности [2]. Гибридизация пчел и сокращение популяций аборигенных пчел – актуальная проблема мирового пчеловодства [6–9], причем подвид *A. m. mellifera* признан исчезающим в Европе [10, 11]. Гибриды менее адаптированы к изменяющимся условиям природной среды, характеризуются более высоким уровнем заболеваемости и снижением иммунитета [5, 12].

В условиях гибридизации классический морфометрический метод исследования пчел не всегда является информативным [3, 13]. Широко используется анализ полиморфизма митохондриальной ДНК (мтДНК), позволяющий определить происхождение семьи только по линии матки [14]. Разработанный сотрудниками НПЦ «Апис» алгоритм, включающий морфометрическое изучение трех параметров крыла и анализ межгенного локуса *COI-COII* мтДНК, позволяет однозначно установить породную принадлежность изучаемой семьи [2, 3].

Результаты исследования породного состава медоносных пчел с использованием метода морфометрии и мтДНК-анализа показали, что большинство пчелиных семей, обитающих в Сибири, являются гибридами [2]. Вместе с тем на территории Сибири выявлены популяции среднерусской породы (обская, енисейская и др.). Для пчел сибирских популяций описаны новые митотипы на основании секвенирования аллелей локуса *COI-COII* мтДНК, что позволяет предположить существование сибирского экотипа *A. m. mellifera* [4].

Генетическое разнообразие медоносной пчелы по микросателлитным локусам

Исследование медоносных пчел сибирских популяций, включая среднерусскую пчелу, с использованием микросателлитных локусов (SSR) позволило описать генетическое разнообразие местных пчел и оценить уровень интрогрессии генов линии С («южные» породы) в линию М (среднерусская порода).

На основании анализа полиморфизма 31 SSR-маркера разработана база данных по вариабельности микросателлитных локусов для пчел среднерусской породы, обитающей в Сибири, и проведена оценка информативности изученных ДНК-маркеров для идентификации разных пород пчел, относящихся к линиям М и С [2]. По степени информативности выявлены

ДНК-маркеры, имеющие породо- или экоспецифичные аллели. Выявлен низкий уровень интрогрессии генов линии С в линию М, что свидетельствует о чистопородности семей среднерусских пчел сибирских популяций. Сравнительный анализ генетического разнообразия пчел подвида *A. m. mellifera* разных популяций России (Сибирь, Урал (бурзянская популяция)) и Европы выявил существенные отличия выборок сибирских пчел от выборок пчел бурзянской и европейских популяций, что также подтверждает существование сибирского экотипа среднерусской породы [2, 3].

Эколого-генетические исследования медоносной пчелы

В последние годы в мировом пчеловодстве особое внимание уделяется исследованиям взаимодействий генетических и средовых факторов в различных популяциях *A. mellifera*, которые показывают лучшую адаптированность местных пчел по сравнению с завезенными коммерческими линиями и гибридами [15–17].

Для оценки адаптивного потенциала среднерусских пчел в условиях Сибири и сравнительной характеристики чистопородных и гибридных семей изучена многолетняя динамика биологических, поведенческих и хозяйственных признаков пчелиных семей [5]. Чистопородные семьи темных лесных пчел характеризуются более высокими показателями основных признаков по сравнению с гибридами. Результаты многолетнего эксперимента по перемещению семей темной лесной пчелы обской и енисейской популяций в новые условия обитания на территории Сибири свидетельствуют о высоком адаптационном потенциале семей, особенно при разведении в южных районах. Для повышения медопродуктивности семей в северных районах необходимы корректировка методов пчеловодения и проведение селекционных мероприятий.

С целью сохранения уникальных сибирских популяций и генофонда *A. m. mellifera* в Томской области создается пчелопитомник среднерусской породы, племенное ядро которого представлено семьями обской и енисейской популяций. На основе эколого-генетических исследований разрабатываются технологии по культивированию чистопородных пчел, повышению адаптированности и продуктивности семей в суровых природно-климатических условиях Сибири, включая программы селекции.

Селекционно-племенная работа в пчелопитомнике

Селекционно-племенная работа в пчелопитомнике, включающая классические методы и использование молекулярных маркеров, направлена на сохранение аборигенных популяций *A. m. mellifera* от скрещивания с завозимыми пчелами, повышение генетического и адаптационного потенциала темной лесной пчелы, хорошо приспособленной к условиям Сибири. Нами впервые выявлены микросателлитные локусы, значимые для определения риска развития нозематоза у темной лесной пчелы [18]. Для отбора высоко-

продуктивных по маточному молочку семей *A. m. mellifera* нами используется микросателлитный локус *mrjp3*, локализованный в гене, кодирующем основные белки маточного молочка (маркер-опосредованная селекция) [19].

Заключение

Исследования, проводимые в Томском государственном университете, способствуют сохранению сибирских популяций и генофонда темной лесной пчелы, развитию лучших признаков пчелиных семей путем дальнейшей селекции и создания высокопродуктивных линий. Полученные результаты являются основой научно обоснованного алгоритма проведения селекционной работы по отбору и разведению семей темной лесной пчелы, адаптированных к локальным природно-климатическим условиям и обладающих высокими хозяйственно полезными признаками. Дальнейшие исследования будут направлены на создание высокопродуктивных селекционных линий темной лесной пчелы и проведение генетической паспортизации семей. Перспективными являются исследования, связанные с поиском ДНК-маркеров, ассоциированных с хозяйственными признаками, например, продуктивностью маточного молочка или устойчивостью к болезням, а также разработка подходов для проведения молекулярной селекции медоносной пчелы.

Список источников

1. Конусова О.Л., Погорелов Ю.Л., Островерхова Н.В., Нечипуренко А.О., Воротов А.А., Климова Е.А., Прокопьев А.С. Медоносная пчела и пчеловодство в Томской области: прошлое, настоящее и будущее // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2009. № 4 (8). С. 15–28.
2. Островерхова Н.В., Россейкина С.А., Конусова О.Л., Кучер А.Н., Киреева Т.Н. Разнообразие медоносной пчелы *Apis mellifera* L. в Томской области по морфометрическим и молекулярно-генетическим маркерам // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2019. № 47. С. 142–173. doi: 10.17223/19988591/47/8
3. Островерхова Н.В., Конусова О.Л. Некоторые проблемы идентификации подвидов медоносной пчелы и их решение на примере изучения *Apis mellifera* в Сибири // Сельскохозяйственная биология. 2022. Т. 57, № 2. С. 283–303. doi: 10.15389/agrobiology.2022.2.283rus
4. Ostroverkhova N.V., Rosseykina S.A. Novel haplotypes of the COI-COII mtDNA region in the dark forest bee, *Apis mellifera mellifera* L., 1758 // Russian Entomological Journal. 2023. Vol. 32, № 4. PP. 416–425. doi: 10.15298/rusentj.32.4.08
5. Ostroverkhova N.V., Rosseykina S.A., Yaltonskaya I.A., Filinov M.S. Estimates of the vitality and performances of *Apis mellifera mellifera* and hybrid honey bee colonies in Siberia: a 13-year study // PeerJ. 2024. Vol. 12. e17354. doi: 10.7717/peerj.17354
6. Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Петухов А.В., Николенко А.Г. Молекулярно-генетический анализ пяти сохранившихся резерватов темной лесной пчелы *Apis mellifera mellifera* Урала и Поволжья // Генетика. 2016. Т. 52, № 8. С. 931–942. doi: 10.7868/S0016675816060059
7. De la Rúa P., Jaffé R., Dall'Olio R., Muñoz I., Serrano J. Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees // Apidologie. 2009. Vol. 40, № 3. PP. 263–284. doi: 10.1051/apido/2009027
8. Pinto M.A., Henriques D., Chávez-Galarza J., Kryger P., Garnery L., van der Zee R., Dahle B., Soland-Reckeweg G., De la Rúa P., Dall'Olio R., Carreck N.L., Johnston J.S. Genetic integrity of the dark European honey bee (*Apis mellifera mellifera*) from protected

- populations: a genome-wide assessment using SNPs and mtDNA sequence data // Journal of Apicultural Research. 2014. Vol. 53. PP. 269–278. doi: 10.3896/IBRA.1.53.2.08
9. Parejo M., Henriques D., Pinto M.A., Soland-Reckeweg G., Neuditschko M. Empirical comparison of microsatellite and SNP markers to estimate introgression in *Apis mellifera mellifera* // Journal of Apicultural Research. 2018. Vol. 57, № 4. PP. 551–564. doi: 10.1080/00218839.2018.1494894
 10. Jensen A.B., Palmer K.A., Boomsma J.J., Pedersen B.V. Varying degrees of *Apis mellifera ligustica* introgression in protected populations of the black honeybee, *Apis mellifera mellifera*, in northwest Europe // Molecular Ecology. 2005. Vol. 14, № 1. PP. 93–106. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02399.x
 11. Muñoz I., Henriques D., Johnston J.S., Chávez-Galarza J., Kryger P., Pinto M.A. Reduced SNP panels for genetic identification and introgression analysis in the dark honey bee (*Apis mellifera mellifera*) // PLoS One. 2015. Vol. 10, № 4. e0124365. 18 p. doi: 10.1371/journal.pone.0124365
 12. Монахова М.А., Горячева И.И., Кривцов Н.И. Генетическая паспортизация *Apis mellifera*. Проблемы и методы // Пчеловодство. 2009. № 4. С. 12–13.
 13. Nawrocka A., Kandemir İ., Fuchs S., Tofilski A. Computer software for identification of honey bee subspecies and evolutionary lineages // Apidologie. 2018. Vol. 49. PP. 172–184. doi: 10.1007/s13592-017-0538-y
 14. Meixner M.D., Pinto M.A., Bouga M., Kryger P., Ivanova E., Fuchs S. Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera* // Journal of Apicultural Research. 2013. Vol. 52, № 4. PP. 1–28. doi: 10.3896/IBRA.1.52.4.05
 15. Büchler R., Costa C., Hatjina F., Andonov S., Meixner M.D., Le Conte Y., Uzunov A., Berg S., Bienkowska M., Bouga M., Drazic M., Dyrba W., Kryger P., Panasiuk B., Pechhacker H., Petrov P., Kezić N., Korpela S., Wilde J. The influence of genetic origin and its interaction with environmental effects on the survival of *Apis mellifera* L. colonies in Europe // Journal of Apicultural Research. 2014. Vol. 53, № 2. PP. 205–214. doi: 10.3896/IBRA.1.53.2.03
 16. Meixner M.D., Kryger P., Costa C. Effects of genotype, environment, and their interactions on honey bee health in Europe // Current Opinion in Insect Science. 2015. Vol. 10. PP. 177–184. doi: 10.1016/j.cois.2015.05.010
 17. Kovačić M., Puškadija Z., Dražić M.M., Uzunov A., Meixner M.D., Büchler R. Effects of selection and local adaptation on resilience and economic suitability in *Apis mellifera carnica* // Apidologie. 2020. Vol. 51, № 11. PP. 1062–1073. doi: 10.1007/s13592-020-00783-0
 18. Ostroverkhova N.V. Association between the microsatellite Ap243, AC117 and SV185 polymorphisms and *Nosema* disease in the dark forest bee *Apis mellifera mellifera* // Veterinary Sciences. 2021. Vol. 8. 2. doi: 10.3390/vetsci8010002
 19. Parpinelli R.S., Ruvolo-Takasusuki M.C.C., Toledo V.A.A. MRJP microsatellite markers in Africanized *Apis mellifera* colonies selected on the basis of royal jelly production // Genetics and Molecular Research. 2014. Vol. 13, № 3. PP. 6724–6733. doi: 10.4238/2014.August.28.16

References

1. Konusova OL, Pogorelov YuL, Ostroverkhova NV, Nechipurenko AO, Vorotov AA, Klimova EA, Prokopiev AS. Honey bee and bee-farming in the Tomsk region: Past, present and future. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2009;4(8):15-28. In Russian
2. Ostroverkhova NV, Rosseykina SA, Konusova OL, Kucher AN, Kireeva TN. Diversity of the honeybee *Apis mellifera* L. in Tomsk region according to morphometric and molecular genetic markers. *Vestnik Tomskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Biologiya - Tomsk State University Journal of Biology*. 2019;47:142-173. doi: 10.17223/19988591/47/8. In Russian, English summary

3. Ostroverkhova NV, Konusova OL. Some problems of identification of honeybee subspecies and their solution on the example of studying the *Apis mellifera* in Siberia. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya*. 2022;57(2):283-303. doi: 10.15389/agrobology.2022.2.283rus. In Russian, English summary
4. Ostroverkhova NV, Rosseykina SA. Novel haplotypes of the COI-COII mtDNA region in the dark forest bee, *Apis mellifera mellifera* L., 1758. *Russian Entomological Journal*. 2023;32(4):416-425. doi: 10.15298/rusentj.32.4.08
5. Ostroverkhova NV, Rosseykina SA, Yaltonskaya IA, Filinov MS. Estimates of the vitality and performances of *Apis mellifera mellifera* and hybrid honey bee colonies in Siberia: a 13-year study. *PeerJ*. 2024;12:e17354. doi: 10.7717/peerj.17354
6. Ilyasov RA, Poskryakov AV, Petukhov AV, Nikolenko AG. Molecular genetic analysis of five extant reserves of black honeybee *Apis mellifera mellifera* in the Urals and the Volga region. *Russian Journal of Genetics*. 2016;52(8):828-839. doi: 10.1134/S1022795416060053
7. De la Rúa P, Jaffé R, Dall'Olio R, Muñoz I, Serrano J. Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees. *Apidologie*. 2009;40(3):263-284. doi: 10.1051/apido/2009027
8. Pinto MA, Henriques D, Chávez-Galarza J, Kryger P, Garnery L, van der Zee R, Dahle B, Soland-Reckeweg G, De la Rúa P, Dall'Olio R, Carreck NL, Johnston JS. Genetic integrity of the dark European honey bee (*Apis mellifera mellifera*) from protected populations: a genome-wide assessment using SNPs and mtDNA sequence data. *Journal of Apicultural Research*. 2014;53:269-278. doi: 10.3896/IBRA.1.53.2.08
9. Parejo M, Henriques D, Pinto MA, Soland-Reckeweg G, Neuditschko M. Empirical comparison of microsatellite and SNP markers to estimate introgression in *Apis mellifera mellifera*. *Journal of Apicultural Research*. 2018;57(4):551-564. doi: 10.1080/00218839.2018.1494894
10. Jensen AB, Palmer KA, Boomsma JJ, Pedersen BV. Varying degrees of *Apis mellifera ligustica* introgression in protected populations of the black honeybee, *Apis mellifera mellifera*, in northwest Europe. *Molecular Ecology*. 2005;14(1):93-106. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02399.x
11. Muñoz I, Henriques D, Johnston JS, Chávez-Galarza J, Kryger P, Pinto MA. Reduced SNP panels for genetic identification and introgression analysis in the dark honey bee (*Apis mellifera mellifera*). *PLoS One*. 2015;10(4):e0124365. doi: 10.1371/journal.pone.0124365
12. Monahova MA, Goryacheva II, Krivcov NI. Geneticheskaya passportizaciya *Apis mellifera*. Problemy i metody [Genetic certification of *Apis mellifera*. Problems and methods]. *Pchelovodstvo = Beekeeping*. 2009;4:12-13. In Russian
13. Nawrocka A, Kandemir İ, Fuchs S, Tofilski A. Computer software for identification of honey bee subspecies and evolutionary lineages. *Apidologie*. 2018;49:172-184. doi: 10.1007/s13592-017-0538-y
14. Meixner MD, Pinto MA, Bouga M, Kryger P, Ivanova E, Fuchs S. Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*. 2013;52(4):1-28. doi: 10.3896/IBRA.1.52.4.05
15. Büchler R, Costa C, Hatjina F, Andonov S, Meixner MD, Le Conte Y, Uzunov A, Berg S, Bienkowska M, Bouga M, Drazic M, Dyrba W, Kryger P, Panasiuk B, Pechhacker H, Petrov P, Kezić N, Korpela S, Wilde J. The influence of genetic origin and its interaction with environmental effects on the survival of *Apis mellifera* L. colonies in Europe. *Journal Apicultural Research*. 2014;53(2):205-214. doi: 10.3896/IBRA.1.53.2.03
16. Meixner MD, Kryger P, Costa C. Effects of genotype, environment, and their interactions on honey bee health in Europe. *Current Opinion in Insect Science*. 2015;10:177-184. doi: 10.1016/j.cois.2015.05.010
17. Kovačić M, Puškadija Z, Dražić MM, Uzunov A, Meixner MD, Büchler R. Effects of selection and local adaptation on resilience and economic suitability in *Apis mellifera carnica*. *Apidologie*. 2020;51(11):1062-1073. doi: 10.1007/s13592-020-00783-0
18. Ostroverkhova NV. Association between the microsatellite Ap243, AC117 and SV185 polymorphisms and *Nosema* disease in the dark forest bee *Apis mellifera mellifera*. *Veterinary Sciences*. 2021;8(1):2. doi: 10.3390/vetsci8010002

19. Parpinelli RS, Ruvolo-Takasusuki MCC, Toledo VAA. MRJP microsatellite markers in Africanized *Apis mellifera* colonies selected on the basis of royal jelly production. *Genetics and Molecular Research*. 2014;13(3):6724-6733. doi: 10.4238/2014.August.28.16

Информация об авторе:

Островерхова Надежда Васильевна, доцент, д-р биол. наук, профессор кафедры зоологии беспозвоночных Томского государственного университета (Томск, Россия).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-9837-4905>

E-mail: nvostrov@mail.ru

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Information about the author:

Nadezhda V. Ostroverkhova, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Department of Invertebrate Zoology, Institute of Biology, Tomsk State University (Tomsk, Russia).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-9837-4905>

E-mail: nvostrov@mail.ru

The Author declares no conflict of interest.

*Статья поступила в редакцию 25.08.2024;
одобрена после рецензирования 20.11.2024; принята к публикации 03.03.2025.*

*The article was submitted 25.08.2024;
approved after reviewing 20.11.2024; accepted for publication 03.03.2025.*

Научная статья
УДК 630*165.3
doi: 10.17223/19988591/69/17

Селекционный эффект интрогрессии в хромосому 5D мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) от вида *Aegilops tauschii* Coss.

Татьяна Алексеевна Пшеничникова¹, Ольга Григорьевна Смирнова²

^{1, 2} Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

¹ <https://orcid.org/0000-0001-5639-916X>, wheatpsh@bionet.nsc.ru

² <https://orcid.org/0000-0002-3023-767X>, planta@bionet.nsc.ru

Аннотация. В данном исследовании изучены эффекты переноса (интрогрессии) в яровую мягкую пшеницу фрагмента хромосомы 5D от вида злаковых *Aegilops tauschii* Coss., связанного с размером корневой системы. Интрогрессия приводит к значительному увеличению длины и массы корней. Данный ценный агрономический признак был перенесён в яровой сорт Саратовская 29 (С29), имеющий маленькую и слабую корневую систему. Перенос осуществлён с помощью скрещивания и отбора на целевой признак. Результат отбора оказался успешным, полученные линии отличаются большой корневой системой и могут быть донорами большого размера корней в селекции. Интрогрессия одновременно оказала положительный эффект на содержание клейковины в зерне и продуктивность растений пшеницы.

Ключевые слова: интрогрессия, корневая система, мягкая пшеница, продуктивность, содержание клейковины

Источник финансирования: работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 23-26-10046 совместно с администрацией Новосибирской области (соглашение р-59).

Благодарности: работы проведены в ЦКП репродукции растений Института цитологии и генетики СО РАН (бюджетный проект FWN-2022-0017).

Для цитирования: Пшеничникова Т.А., Смирнова О.Г. Селекционный эффект интрогрессии в хромосому 5D мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) от вида *Aegilops tauschii* Coss. // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2025. № 69. С. 147–152. doi: 10.17223/19988591/69/17

Original article
doi: 10.17223/19988591/69/17

Breeding effect of introgression into chromosome 5D of common wheat (*Triticum aestivum* L.) from the species *Aegilops tauschii* Coss.

Tatyana A. Pshenichnikova¹, Olga G. Smirnova²

^{1, 2} Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

¹ <https://orcid.org/0000-0001-5639-916X>, wheatpsh@bionet.nsc.ru

² <https://orcid.org/0000-0002-3023-767X>, planta@bionet.nsc.ru

Summary. Roots are an integral part of the plant organism. This is the main organ that records the soil water status and transmits signals to the shoot. The architecture of the root system determines strong rooting of the plant and effective absorption of nutrients and water from the soil. In wheat (*Triticum aestivum* L., genomic formula AABBDD), the genes that determine the parameters of the root system are still unknown. It was shown that synthetic wheats obtained using the species *Aegilops tauschii* Coss. have a large root system. The single chromosome substitution line of Chinese Spring (CS) variety, carrying 5D chromosome from a synthetic wheat has a large root system. On its basis, recombinant (introgressed) lines were obtained that carry fragments of chromosome 5D of *Ae. tauschii* and have a large length and weight of roots (see Fig. 1 and Table 1). The breeding goal of our studies was to transfer this valuable trait to the spring variety Saratovskaya 29 (S29) with a small root system. In the course of successive selections from hybrids between S29 and IL 5D-5 line, early maturing families with a large root system were obtained. Their average root length was 1.4 times higher than that of S29, and their weight was more than three times greater (see Table 2). At the same time, the lines showed a grain weight per plant two to five times greater than that of S29 while maintaining the thousand-grain weight at the level of the parent variety. Most of the lines inherited a high protein and gluten content in grain. The presence of such a gene in this region of introgression in chromosome 5D was predicted earlier. One of the lines, along with a powerful root system and high gluten content, demonstrated excellent physical properties of flour and dough and may be classified as a strong wheat.

The article contains 1 Figure, 2 Tables, 6 References.

Keywords: introgression, root system, common wheat, productivity, gluten content

Fundings: This work was partially supported by Russian Scientific Foundation (Grant No 23-26-10046) and Agreement with Novosibirsk Region p-59).

Acknowledgments: The Center for Collective Use of Plant Reproduction of the Institute of Cytology and Genetics SB RAS (budget project FWN-2022-0017).

For citation: Pshenichnikova TA, Smirnova OG. Breeding effect of introgression into chromosome 5D of common wheat (*Triticum aestivum* L.) from the species *Aegilops tauschii* Coss. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya* = *Tomsk State University Journal of Biology*. 2025;69:147-152. doi: 10.17223/19988591/69/17

Введение

Корни – важнейшая часть растительного организма. Это основной орган, фиксирующий состояние водного режима почвы и передающий сигналы побегу. Архитектура корневой системы определяет прочное укоренение растений и эффективное поглощение питательных веществ и воды из почвы [1]. У мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L., геномная формула AABBDD, $2n = 42$, $6x = 7$), второй по значимости сельскохозяйственной культуры в мире, генетический контроль этого признака ограничен идентификацией в ряде хромосом пшеницы локусов количественных признаков (QTL), связанных с различными параметрами корневой системы [2]. Синтетические пшеницы с аналогичным гексаплоидным геномом, где донором генома D являются различные образцы вида *Aegilops tauschii* Coss, считаются важным источником улучшения мягкой пшеницы. Было отмечено, что такие синтетики имеют большую корневую систему [3]. Ранее мы обнаружили, что локус

Vrn-1, контролирующей яровой или озимый тип развития, участвует в генетическом контроле длины и массы корней [4]. Данный результат был получен с использованием яровых сортов – носителей доминантных аллелей генов *Vrn-A1* и *Vrn-B1*, а также линий с интрогрессиями от видов-сородичей пшеницы. Мы также показали, что интрогрессия хромосомы 5D в геном сорта Чайниз Спринг – мировой модели для изучения генома пшеницы – приводит к значительному увеличению длины и массы корней [5]. Целью данного исследования было перенести ценный признак из озимого образца в яровой российский сорт и показать его эффекты на другие агрономически важные показатели.

Материалы и методы

В работе использованы три озимые интрогрессированные линии ИЛ 5D-5, ИЛ 5D-6 и ИЛ 5D-10 сорта Чайниз Спринг (ЧС) с интрогрессиями в районе гена *Vrn-D1* хромосомы 5D [6], а также семьи пятого поколения, полученные скрещиванием ярового сорта Саратовская 29 (С29) с линией ИЛ 5D-5. Эти семьи F5 (WR) получены отбором в последовательных поколениях на яровость и большую корневую систему. В качестве изучаемых признаков использовали длину и сухую массу корней. Эксперименты проводили в условиях гидропонной теплицы Института цитологии и генетики СО РАН. Условия выращивания растений и учёта признаков описаны ранее [4]. Для каждого генотипа было выращено по 6 растений в двух повторностях в течение не менее трёх тепличных сезонов. Для оценки достоверности отличий между сортом-реципиентом и линиями с интрогрессиями использовали критерий Стьюдента.

Результаты исследования и обсуждение

Увеличение размера корневой системы было связано с интрогрессией в район гена *Vrn-D1* хромосомы 5D и озимым образом жизни линий ИЛ 5D-5, ИЛ 5D-6 и ИЛ 5D-10. Эффект этой интрогрессии продемонстрирован на рис. 1 и в табл. 1. Длина корней увеличилась на 8 см, а масса – в 4–5 раз. Так как линии являются продуктом рекомбинации между синтетической пшеницей и сортом ЧС, то таким же образом возможен перенос этой ценной интрогрессии в яровой сорт. Для этого был использован сорт Саратовская 29 (С29) со слабой корневой системой.

После скрещивания с линией ИЛ 5D-5 и пятикратного отбора на яровость и размер корневой системы было получено 15 линий WR. Они характеризовались разнообразием по дате цветения от ранних до среднеранних и проявляли разнообразие по длине и массе корневой системы. По морфологии их корневая система была схожа с корневой системой линии ИЛ 5D-5. Их отличало неограниченное вторичное ветвление корней, которое не прекращалось даже после цветения и созревания зерна. В табл. 2 представлены средние значения двух целевых признаков корневой системы. Длина корней превышает как значение сорта С29, так и интрогрессированной линии. Масса корней была значительно выше, чем у ярового сорта, и приблизительно соответствовала линии ИЛ 5D-5.



Рис. 1. Корневая система сорта-реципиента Чайниз Спринг (ЧС) (1) и линий ИЛ 5D-5 (2), ИЛ 5D-6 (3) и ИЛ 5D-10 (4) с интрогрессиями в хромосому 5D от *Aegilops tauschii*

[Fig. 1. Root system of the recipient variety Chinese Spring (1) and lines IL 5D-5 (2), IL 5D-6 (3) and IL 5D-10 (4) with introgression into chromosome 5D from *Aegilops tauschii*]

Таблица 1 [Table 1]

Среднее значение длины и массы корней у линий мягкой пшеницы с интрогрессией в хромосому 5D от *Ae. tauschii* (ИЛ) по сравнению с сортом-реципиентом
[Mean root length and weight in bread wheat lines with introgression into chromosome 5D from *Ae. tauschii* (IL) compared to the recipient]

Генотипы [Genotypes]	Длина корней, см [Root length, cm]	Масса корней, г [Root weight, g]
ИЛ 5D-5 [IL 5D-5]	28,0 ± 3,5***	1,6 ± 0,4**
ИЛ 5D-6 [IL 5D-6]	29,2 ± 2,6***	1,4 ± 0,8**
ИЛ 5D-10 [IL 5D-10]	29,7 ± 3,0***	2,4 ± 0,5*
ЧС-реципиент [CS-recipient]	21,7 ± 2,3***	0,38 ± 0,02

Примечание. Уровни значимости согласно критерию Фишера: *** – $p < 0,001$; ** – $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

[Note. Significance levels according to Fisher's criterion: *** - $p < 0.001$; ** - $p < 0.01$; * $p < 0.05$].

Таблица 2 [Table 2]

Среднее значение длины и массы корней, содержания клейковины, а также компонентов урожая у линий WR с интрогрессией в хромосому 5D от *Ae. tauschii* и их родительских форм
[Average values of root length and weight, gluten content and yield components in lines WR with introgression into chromosome 5D from *Ae. tauschii* and their parental forms]

Генотипы [Genotypes]	Длина корней, см [Root length, cm]	Масса корней, г [Root weight, g]	Масса зерна с растения, г [Grain weight per plant, g]	Содержание клейковины, % [Gluten content, %]	Масса 1 000 зёрен, г [Thousand grain weight, g]
C29 [S29]	22,1 ± 2,9	0,32 ± 0,16	3,5 ± 0,3	30,8	40,4
ИЛ 5D-5 [IL 5D-5*]	28,0 ± 3,5	1,6 ± 0,9	9,0 ± 3,5	41,5 ± 1,0	26,1 ± 2,6
Линии [WR Lines WR]	33,0 ± 4,5	1,0 ± 0,5	11,7 ± 2,0	37,5 ± 2,3	37,7 ± 2,4

Примечание. * – яровизация 60 дней.

[Note. * - 60 days vernalization].

Положительным, хотя и непредвиденным, следствием отбора на размер корневой системы было значительное увеличение содержания клейковины в зерне (см. табл. 2). Оно превысило значения обоих родителей. Также положительным и ценным свойством интрогрессии стало значительное среднее увеличение продуктивности линий WR. У них увеличилась средняя масса зерна с растения более чем в 3 раза по сравнению с яровым сортом С29 (см. табл. 2). При этом средняя масса 1 000 зёрен была сопоставима с сортом С29, который характеризуется сохранением этого признака в различных условиях.

Заключение

Полученные в результате эксперимента результаты позволяют говорить о переносе из вида *Ae. tauschii* селекционно-ценных генов, которые увеличивают размеры корневой системы и одновременно улучшают такие агрономические важные признаки, как продуктивность растения и содержание клейковины в зерне.

Список источников

1. Ober E.S., Alahmad S., Cockram J. Forestan C., Hickey L.T., Kant J., Maccaferri M., Marr E., Milner M., Pinto F., Rambla C., Reynolds M., Salvi S., Sciara G., Snowdon R.J., Thomelin P., Tuberosa R., Uauy C., Voss-Fels K.P., Wallington E., Watt M. Wheat root systems as a breeding target for climate resilience // Theoretical and Applied Genetics. 2021. Vol. 134, № 4. PP. 1645–1662. doi: 10.1007/s00122-021-03819-w
2. Soriano J.M., Alvaro F. Discovering consensus genomic regions in wheat for root-related traits by QTL meta-analysis // Scientific Reports. 2019. 10537. doi: 10.1038/s41598-019-47038-2
3. Шаманин В.П., Потоцкая И.В., Шепелев С.С., Пожерукова В.Е., Моргунов А.И. Морфометрические параметры корневой системы и продуктивность растений у синтетических линий яровой мягкой пшеницы в условиях Западной Сибири в связи с засухоустойчивостью // Сельскохозяйственная биология. 2018. Т. 53, № 3. С. 587–597.
4. Смирнова О.Г. Пшеничникова Т.А. Взаимосвязь между генетическим статусом локуса *Vrn-1* и размерами корневой системы у мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2021. Т. 25, № 8. С. 805–811. doi: 10.18699/VJ21.093
5. Pshenichnikova T.A., Smirnova O.G., Simonov A.V., Shchukina L.V., Morozova E.V., Lohwasser U., Börner A // The relationship between root system development and vernalization under contrasting irrigation in bread wheat lines with the introgressions from a synthetic hexaploid // Plant Growth Regulation. 2020. Vol. 92, № 3. PP. 583–595. doi: 10.1007/s10725-020-00666-5
6. Pestsova E.G., Börner A., Röder M.S. Development and QTL assessment of *Triticum aestivum*–*Aegilops tauschii* introgression lines. // Theoretical and Applied Genetics. 2006. Vol. 112, № 2. PP. 634–647. doi:10.1111/j.1601-5223.2001.00139.x

References

1. Ober ES, Alahmad S, Cockram J Forestan C, Hickey LT, Kant J, Maccaferri M, Marr E, Milner M, Pinto F, Rambla C, Reynolds M., Salvi S, Sciara G, Snowdon RJ, Thomelin P, Tuberosa R, Uauy C, Voss-Fels KP, Wallington E, Watt M. Wheat root systems as a

- breeding target for climate resilience. *Theoretical and Applied Genetics*. 2021;134(4):1645-1662. doi: 10.1007/s00122-021-03819-w
2. Soriano JM, Alvaro F. Discovering consensus genomic regions in wheat for root-related traits by QTL meta-analysis. *Scientific Reports*. 2019;10:537. doi: 10.1038/s41598-019-47038-2
 3. Shamanin VP, Pototskaya IV, Shepelev SS, Pozherukova V, Morgounov AI. Root habitus and plant productivity of spring bread wheat synthetic lines in Western Siberia, as connected with breeding for drought tolerance. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya*. 2018;53(3):587-597. In Russian, English summary
 4. Smirnova OG, Pshenichnikova TA. The relationship between the genetic status of the *Vrn-1* locus and the size of the root system in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii*. 2021;25(8):805-811. doi: 10.18699/VJ21.093
 5. Pshenichnikova TA, Smirnova OG, Simonov AV, Shchukina LV, Morozova EV, Lohwasser U, Börner A. The relationship between root system development and vernalization under contrasting irrigation in bread wheat lines with the introgressions from a synthetic hexaploid. *Plant Growth Regulation*. 2020;92(3):583-595. doi: 10.1007/s10725-020-00666-5
 6. Pestsova EG, Börner A, Röder MS. Development and QTL assessment of *Triticum aestivum*–*Aegilops tauschii* introgression lines. *Theoretical and Applied Genetics*. 2006;112(2):634-647. doi:10.1111/j.1601-5223.2001.00139.x

Информация об авторах:

Пшеничникова Татьяна Алексеевна, канд. биол. наук, с.н.с. сектора генетики качества зерна Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5639-916X>

E-mail: wheatpsh@bionet.nsc.ru

Смирнова Ольга Григорьевна, канд. биол. наук, с.н.с. лаборатории геномной инженерии Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3023-767X>

E-mail: planta@bionet.nsc.ru

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Information about the authors:

Tatyana A. Pshenichnikova, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Sector of the Genetics of Grain Quality, Institute of Cytology and Genetics SB RAS (Novosibirsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5639-916X>

E-mail: wheatpsh@bionet.nsc.ru

Olga G. Smirnova, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Gene Engineering, Institute of Cytology and Genetics SB RAS (Novosibirsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3023-767X>

E-mail: planta@bionet.nsc.ru

The Authors declare no conflict of interest.

Статья поступила в редакцию 25.08.2024;
одобрена после рецензирования 30.11.2024; принята к публикации 03.03.2025.

The article was submitted 25.08.2024;
approved after reviewing 30.11.2024; accepted for publication 03.03.2025.

Научная статья

УДК 575.167, 575.2.084, 581.4

doi: 10.17223/19988591/69/18

Влияние хромосомы 4Th пырея с геном опушения *HLIth* в геноме замещённых линий мягкой пшеницы на адаптацию к засухе

Александр Владимирович Симонов¹, Елена Ивановна Гордеева²,
Светлана Владимировна Осипова³, Лелея Юрьевна Васенина⁴,
Ли Вэньцзянь⁵, Татьяна Алексеевна Пшеничникова⁶

^{1, 2, 4, 5, 6} ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

³ ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск, Россия.

^{4, 5} Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

¹ <https://orcid.org/0000-0001-6708-3822/sialexander@bionet.nsc.ru>

² <https://orcid.org/0000-0003-3166-7409/elgordeeva@bionet.nsc.ru>

³ <https://orcid.org/0000-0001-7025-8590/svetlanaosipova2@mail.ru>

⁴ v.leleya@mail.ru

⁵ <https://orcid.org/0009-0001-4744-5002/liw562530@gmail.com>

⁶ <https://orcid.org/0000-0003-0191-5520/wheatpsh@bionet.nsc.ru>

Аннотация. Климатические изменения требуют уделить внимание механизмам повышения пластичности культур, помимо прочего, адаптивности к засухе. В работе изучены эффекты замещения хромосом 4В и 4D у мягкой яровой пшеницы засухоустойчивого сорта Саратовская 29 (S29) хромосомой 4Th пырея (*Thinopyrum ponticum* (Podp.)). У замещённых линий модифицировано опушение листа, что сказывается на параметрах урожайности в условиях оптимального и дефицитного режимов увлажнения, а также на параметрах фотосинтеза и транспирации. На хромосоме 4В пшеницы находится ген *HLI*, определяющий рост на листовых пластинках большого числа недлинных трихом, формирующих плотный слой опушения. На хромосоме 4Th пырея расположен гомеологичный ген *HLIth*, формирующий опушение листа из длинных разреженных трихом. Замещение пары хромосом 4В на 4Th фенотипически приводит к смене плотного полога трихом редкими длинными трихомами. Замещение пары хромосом 4D на 4Th добавляет редкие длинные трихомы к плотному слою коротких трихом. Модификации опушения листа приводят к изменению уровня испарения воды и поглощения углекислого газа, повышает эффективность использования воды, что в итоге сказывается на урожайном потенциале растений.

Ключевые слова: мягкая пшеница, замещённые линии, *Thinopyrum ponticum* (Podp.), опушение листа, трихомы, засуха, фотосинтез, урожайность

Источник финансирования: РНФ № 23-24-10029 совместно с администрацией Новосибирской области (р-63).

Благодарности: работы проведены в ЦКП репродукции растений Института цитологии и генетики СО РАН (бюджетный проект FWNР-2022-0017).

Для цитирования: Симонов А.В., Гордеева Е.И., Осипова С.В., Васенина Л.Ю., Ли В., Пшеничникова Т.А. Влияние хромосомы 4Th пырея с геном опушения *HLIth* в геноме замещённых линий мягкой пшеницы на адаптацию к засухе // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2025. № 69. С. 153–161. doi: 10.17223/19988591/69/18

The effect of the 4Th chromosome of wheatgrass with the leaf hairiness gene *H1th* in the genome of substituted lines of common wheat on adaptation to drought

Alexander V. Simonov¹, Elena I. Gordeeva², Svetlana V. Osipova³,
Eleya Y. Vasenina⁴, Li Wenjian⁵, Tatyana A. Pshenichnikova⁶

^{1, 2, 4, 5, 6} Institute Citology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk, Russia

^{4, 5} Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

¹ <https://orcid.org/0000-0001-6708-3822> sialexander@bionet.nsc.ru

² <https://orcid.org/0000-0003-3166-7409> elgordeeva@bionet.nsc.ru

³ <https://orcid.org/0000-0001-7025-8590> svetlanaosipova2@mail.ru

⁴ v.leleya@mail.ru

⁵ <https://orcid.org/0009-0001-4744-5002> liw562530@gmail.com

⁶ <https://orcid.org/0000-0003-0191-5520> wheatpsh@bionet.nsc.ru

Summary. Plants adapt to drought using various mechanisms, such as a developed root system and a biochemical system of antioxidant protection. Also, leaf hairiness affects the air surface stability and affects the work of the photosynthetic apparatus, transpiration and assimilation of carbon. The spring variety of common wheat Saratovskaya 29 (S29) is drought-tolerant varieties due to dense leaf pubescence and an active system of antioxidant protection from stress. In chromosome 4B of this variety carries a dominant gene for leaf hairiness *H1th*, which forms a dense layer of short trichomes. In this work, S29 lines with a substitution of chromosomes 4B and 4D for chromosome 4Th from *Thinopyrum ponticum* (Podp.) were studied for drought adaptability. Cultivation was carried out under controlled normal growing and drought conditions in greenhouses and in vegetation chambers. The leaf hairiness contrastingly changed in the substitution lines compared to recipient. In the line S29_4Th(4B) the dense layer of short trichomes was replaced by sparse long trichomes. In the line S29_4Th(4D), rare long trichomes are located among the trichomes characteristic of the recipient. As can be seen from Table 1, the substitution line S29_4Th(4B) formed significantly more productive ears, and the line S29_4Th(4D) formed significantly more grains per plant than the recipient. This effect is observed both under conditions of normal watering and drought. The weight of 1000 grains was about 32 g in both lines under normal watering; this was similar to S29 with sufficient moisture. However, when grown in drought conditions, the grain size dropped significantly. The total grain weight from the plant did not decrease compared to S29 in line S29_4Th(4D) under drought conditions. In the normal watering it was greater. The line S29_4Th(4B) did not change the grain yield under irrigation, it was like in S29, but under drought, the grain weight from the plant slightly decreased due to a decrease in the grain size. The parameters of photosynthesis are given in Table 2. Under drought, the S29_4Th(4B) line used water more efficiently compared to S29 due to a strong decrease in transpiration and a less decrease in the rate of carbon dioxide assimilation. This property may preserve moisture in the soil and can be useful for the plant population when grown in the field under water deficit conditions. The line S29_4Th(4D) under drought practically did not reduce CO₂ assimilation, but significantly increased transpiration. Therefore, the S29_4Th(4D) line will be more productive under optimal water supply conditions.

The article contains 2 Tables, 10 References.

Keywords: common wheat, substitution line, *Thinopyrum ponticum* (Podp.), leaf hairiness, trichomes, draught, photosynthesis, yield parameters

Fundings: This work was partially supported by Russian Scientific Foundation (Grant No 23-24-10029) and Agreement with Novosibirsk Region p-63).

Acknowledgments: The Center for Collective Use of Plant Reproduction of the Institute of Cytology and Genetics SB RAS (budget project FWNr-2022-0017).

For citation: Simonov AV, Gordееva EI, Osipova SV, Vasenina LY, Li W, Pshenichnikova TA. The effect of the 4Th chromosome of wheatgrass with the leaf hairiness gene *Hllth* in the genome of substituted lines of common wheat on adaptation to drought. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2025;69:153-161. doi: 10.17223/19988591/69/18

Введение

Трихомы, покрывающие органы растений, играют роль механической защиты от повреждений насекомыми или пыльными ветрами, рассеивают солнечную радиацию, изменяют характер течений воздуха (ламинарные или турбулентные) в приграничном слое, что сказывается на температуре поверхности, работе устьичного аппарата, транспирации и газообмене и в итоге на урожайном потенциале [1–3]. Яровой сорт мягкой пшеницы Саратовская 29 (S29) относится к засухоустойчивым. Это один из модельных сортов, на котором создано множество коллекций с интрогрессиями генетического материала от других сортов и родственных видов. Листья этого сорта имеют густое опушение из простых трихом длиной порядка 150 мкм [4], контролируемое главным геном *Hll* в хромосоме 4B [5]. В прошлых исследованиях описаны изменения адаптационных свойств линий S29 как с дополнительными доминантными генами опушения, так и без опушения [6, 7]. В данной работе продолжены исследования механизмов засухоустойчивости пшеницы, связанных с замещением хромосом 4B и 4D сорта S29 на хромосому 4Th пырея (*Thinopyrum ponticum* (Podp.)). Первоначально данные замещённые линии создавались как доноры синей окраски зерна для повышения питательных свойств пшеницы [8], однако у них обнаружены контрастное изменение опушения листа в сравнении с реципиентом [9], а также видимые изменения количественных показателей урожайности, что послужило причиной их привлечения в данную работу.

Материалы и методы

В исследовании участвовали растения мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) ярового сорта Саратовская 29 и двух линий с замещением пары хромосом 4B и 4D на пару хромосом 4Th пырея *Thinopyrum ponticum* (Podp.) Barkworth & D.R. Dewey. Хромосома 4Th пырея, перенесённая в геном мягкой пшеницы, содержит гомеоаллельный ген опушения *Hllth* с несколькими эффектами – он формирует единичные трихомы длиной 300–700 мкм и более [10]. Соответственно, у замещённой линии S29_4Th(4B) плотный

слой коротких трихом S29 заменён на редкие длинные, а у замещённой линии S29_4Th(4D) отдельные длинные трихомы формируются помимо большого числа коротких [10].

Для оценки засухоустойчивости изучались компоненты урожайности, а также параметры фотосинтеза растений, выращенных в контрастных условиях увлажнения. Среди параметров урожайности – число продуктивных побегов, число зёрен, масса зерна и масса 1 000 зёрен для главного колоса, вторичных колосьев и всего с растения. Среди параметров фотосинтеза – скорость транспирации (E , ммоль/(м²с)), устьичная проводимость (g_s , ммоль/(м²с)), скорость ассимиляции CO₂ (A , мкмоль/(м²с)), эффективность использования воды (A/E). Для изучения параметров урожайности растения выращивались в гидропонной теплице Центра коллективного пользования репродукции растений ИЦиГ СО РАН по ранее описанной методике [6]. Вариант с оптимальным режимом питания – подача раствора трижды в сутки, остаточная влажность субстрата 30–35% перед очередной подачей. В варианте с засухой режим питания изменялся с периода кушения, подача раствора ограничивалась до 1–2 раз в неделю по мере снижения влажности субстрата до 20–15%. Всего выращивалось по две повторности на поливе и засухе, по 10 растений каждого генотипа. Параметры фотосинтеза изучались в климатической камере Plant Master, установленной на фитотроне СИФИБР СО РАН согласно методике [6]. Каждый генотип выращивался на двух режимах водообеспечения – оптимальном и воддефицитном. Оптимальный режим соответствует 60%-ному содержанию воды от полной влагоемкости почвы, воддефицитный – 30%-ному содержанию воды от полной влагоемкости. В оценке достоверности различий параметров использован t -критерий Стьюдента.

Результаты исследования и обсуждение

Замещение хромосом 4B и 4D у S29 на хромосому 4Th пырея значительно повлияло на фенотип листа растений. Замещённые линии унаследовали от пырея редкие длинные трихомы на листьях (более 400 мкм), а также они сильнее кустились и имели озернённость выше, чем реципиент (табл. 1). Тенденция к кушению у обеих замещённых линий превышала S29 в условиях полива и засухи, при этом на кушение сильнее влияла замена 4B / 4Th, где различия достоверны. На общем числе зёрен, озернённости главного и вторичных колосьев лучше сказалась замена 4D на 4Th, причём на поливе и на засухе. При этом общая масса зерна с растения оказалась выше у линии S29_4Th(4D) только на поливе, а засуха нивелировала весь эффект на массу зерна от замещения хромосомы 4D. Исходный сорт менее подвержен снижению массы 1000 зёрен в засушливых условиях, тогда как обе линии значительно снизили крупность зерна на засухе. В данном плане можно сделать вывод, что замещение хромосом 4B и 4D хромосомой 4Th пырея способствует повышению урожайного потенциала, но только в благоприятных условиях.

Другим аспектом работы стало изучение изменения процессов фотосинтеза и транспирации. Как видно из табл. 2, условия выращивания достоверно влияют на скорость транспирации, ассимиляции углекислого газа и

устыичную проводимость сорта S29. За счёт более резкого снижения на засухе ассимиляции в сравнении с транспирацией падает и эффективность использования воды. Замещённая линия S29_4Th(4B) на засухе достоверно сильнее снизила устьичную проводимость, она в большей степени снижала транспирацию, чем поглощение CO₂, поэтому у этой линии с редкими длинными редкими трихомами на засухе достоверно выросла эффективность использования воды в сравнении с реципиентом.

Таблица 1 [Table 1]

Структурный анализ урожайности замещённых линий в сравнении с реципиентом на поливе и засухе
[The structure analysis of substitution lines compared to recipient]

Гено- типы [Geno- types]	Растение в общем [Parameters per plant]				Главный колос [Main ear]			Вторичные колосья [Secondary ears]	
	Число побегов [Number of tillers]	Число зёрен [Grain number]	Масса зерна, г [Grain weight, g]	Масса 1 000 зёрен, г [Weight of 1000 grains, g]	Число зёрен [Grain number]	Масса зерна, г [Grain weight, g]	Масса 1 000 зёрен, г [Weight of 1000 grains, g]	Число зёрен [Grain number]	Масса зерна, г [Grain weight, g]
Полив [Irrigation]									
S29	3,7 ± 1,1	90,4 ± 33,7	2,89 ± 1,22	31,8 ± 5,6	29,0 ± 4,5	1,04 ± 0,23	35,6 ± 5,9	61,4 ± 32,0	1,86 ± 1,07
S29_4Th (4B)	5,0 ± 1,5*	94,5 ± 35,3	2,86 ± 0,86	31,65 ± 8,5	27,4 ± 9,9	0,8 ± 0,29*	30,0 ± 5,8*	67,1 ± 31,8	2,06 ± 0,82
S29_4Th (4D)	4,2 ± 1,3	110,7 ± 36,6	3,59 ± 1,12	32,7 ± 2,3	36,4 ± 5,0***	1,27 ± 0,15**	35,1 ± 3,1	74,4 ± 35,0	2,32 ± 1,05
Засуха [Drought]									
S29	2,8 ± 0,7	70,1 ± 16,6	2,13 ± 0,68	30,0 ± 4,9	29,4 ± 4,3	0,92 ± 0,21	31,2 ± 5,3	40,8 ± 16,4	1,21 ± 0,60
S29_4Th (4B)	3,8 ± 1,4*	83,8 ± 36,1	1,98 ± 0,90	23,9 ± 5,7	28,5 ± 12,4	0,74 ± 0,35	26,0 ± 7,4*	55,3 ± 29,5	1,24 ± 0,69
S29_4Th (4D)	3,4 ± 1,2	88,3 ± 23,7*	2,14 ± 0,50	24,6 ± 3,3**	33,6 ± 5,6*	0,87 ± 0,13	26,3 ± 3,2**	54,8 ± 24,6	1,26 ± 0,54

Примечание. Различия параметров между контролем и засухой (+ – $p < 0,05$; ++ – $p < 0,01$; +++ – $p < 0,001$); различия параметров между сортом Саратовская 29 и линиями, созданными на ее генетической основе. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

[Note. Reliability of parameter differences between irrigation and drought (+ – $p < 0,05$; ++ – $p < 0,01$; +++ – $p < 0,001$). Reliability of parameter differences between the substitution lines and the recipient * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$].

В условиях засухи растения с этим генотипом индивидуально сформировали несколько меньшую массу зерна в сравнении с S29, хотя количественно зёрен было больше (см. табл. 1). Но более экономный расход влаги почвы и повышенная эффективность использования воды (табл. 2) в полевых условиях теоретически могли бы положительно сказаться на продуктивности популяции растений. Иначе реагировала на засуху линия S29_4Th(4D) с комбинированным опушением. У неё уровень ассимиляции CO₂ оставался стабильным на поливе и засухе.

Таблица 2 [Table 2]

**Параметры фотосинтеза замещённых линий в сравнении
с реципиентом на поливе и засухе**
[The photosynthesis parameters of substitution lines compared to recipient]

Гено- типы [Geno- types]	Скорость транспи- рации [Transpiration rate (E)] mmol/(m ² s)		Устьичная проводимость [Stomatal conductivity (gs)] mmol/(m ² s)		Скорость ассими- ляции CO ₂ [CO ₂ assimilation rate (A)] μmol/(m ² s)		Эффективность использования воды [Water use efficiency (A/E)]	
	Полив [Irriga- tion]	Засуха [Drought]	Полив [Irriga- tion]	Засуха [Drought]	Полив [Irriga- tion]	Засуха [Drought]	Полив [Irriga- tion]	Засуха [Drought]
S29	1,61 ± 0,29 ++	1,30 ± 0,23	125,5 ± 25,5 +++	96,1 ± 18,8	3,74 ± 0,49 +++	2,63 ± 0,59	2,38 ± 0,42 + *	2,06 ± 0,45
S29_4Th (4B)	1,59 ± 0,18 +++	1,12 ± 0,20 *	120,3 ± 15,0 +++	82,5 ± 15,9 *	3,54 ± 0,53 +++	2,74 ± 0,43	2,26 ± 0,39	2,48 ± 0,38 **
S29_4Th (4D)	1,37 ± 0,22 +++**	1,88 ± 0,23 ***	105,1 ± 19,1 +++*	146,6 ± 19,6 ***	3,3 ± 0,3 ***	3,17 ± 0,33 ***	2,45 ± 0,54 +++	1,71 ± 0,23 **

Примечание. См. примечание табл. 1.

[Note. See notes in Table 1].

При этом в условиях оптимального полива испарение воды и устьичная проводимость оказались существенно снижены в сравнении с S29, а на засухе эти параметры, напротив, были достоверно выше. В условиях засухи это достоверно снижало эффективность использования воды в сравнении с реципиентом на четверть. Как видно из табл. 1, такая тактика даёт растениям преимущество в условиях достаточного увлажнения, позволяя производить больше полновесного зерна.

Заключение

Проведённые исследования показывают, что замещение хромосом 4B на 4Th у Саратовской 29, заменяющее густое короткое опушение редкими длинными трихомами, хотя и увеличивает эффективность использования воды, но в целом ведёт к снижению скорости фотосинтеза и урожайности на засухе. Замещение же хромосом 4D на 4Th, дополняющее опушение реципиента единичными длинными трихомами, благоприятно сказывается на урожайности в условиях оптимальной влажности почвы, но не позволяет реализовать урожайный потенциал в условиях засухи из-за менее эффективного использования воды.

Список источников

1. Kaur J., Kariyat R. Role of trichomes in plant stress biology // Evolutionary Ecology of Plant-Herbivore Interaction. 2020. PP. 15–35. doi: 10.1007/978-3-030-46012-9_2
2. Hamaoka N., Yasui H., Yamagata Y., Inoue Y., Furuya N., Araki T., Ueno O., Yoshimura A. A hairy-leaf gene, BLANKET LEAF, of wild *Oryza nivara* increases photosynthetic water use efficiency in rice // Rice. 2017. Vol. 10, № 1. PP. 1–11. doi: 10.1186/s12284-017-0158-1

3. Schreuder M.D.J., Brewer C.A., Heine C. Modelled Influences of Non-exchanging Trichomes on Leaf Boundary Layers and Gas Exchange // *Journal of Theoretical Biology*. 2001. Vol. 210, № 1. PP. 23–32. doi: 10.1006/jtbi.2001.2285
4. Pshenichnikova T.A., Doroshkov A.V., Simonov A.V., Afonnikov D.A., Börner A. Diversity of leaf pubescence in bread wheat and relative species // *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2017. Vol. 64, № 7. PP. 1761–1773. doi: 10.1007/s10722-016-0471-3
5. Dobrovolskaya O.B., Pshenichnikova T.A., Arbuzova V.S., Lohwasser U., Röder M.S., Börner A. Molecular mapping of genes determining hairy leaf character in common wheat with respect to other species of the *Triticeae* // *Euphytica*. 2007. Vol. 155. PP. 285–293. doi: 10.1007/s10681-006-9329-7
6. Осипова С.В., Рудиковский А.В., Пермяков А.В., Рудиковская Е.Г., Пермякова М.Д., Верхотуров В.В., Пшеничникова Т.А. Физиологические реакции линий пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с генетически различным опушением листа на водный дефицит // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020. Вып. 24, № 8. С. 813–820. doi: 10.18699/VJ20.678
7. Pshenichnikova T.A., Doroshkov A.V., Osipova S.V., Permyakov A.V., Permyakova M.D., Efimov V.M., Afonnikov D.A. Quantitative characteristics of pubescence in wheat (*Triticum aestivum* L.) are associated with the parameters of gas exchange and chlorophyll fluorescence under conditions of normal and limited water supply // *Planta*. 2019. Vol. 249, № 3. PP. 839–847. doi: 10.1007/s00425-018-3049-9
8. Osipova S.V., Permyakov A.V., Permyakova M.D., Pshenichnikova T.A., Genaev M.A., Börner A. The antioxidant enzymes activity in leaves of inter – varietal substitution lines of wheat (*Triticum aestivum* L.) with different tolerance to soil water deficit // *Acta Physiologiae Plantarum*. 2013. Vol. 5, № 8. PP. 2455–2465. doi: 10.1007/s11738-013-1280-3
9. Gordееva E., Badaeva E., Yudina R., Shchukina L., Shoeva O. and Khlestkina E. Marker-assisted development of a blue-grained substitution line carrying the *Thinopyrum ponticum* chromosome 4Th(4D) in the spring bread wheat Saratovskaya 29 background // *Agronomy*. 2019. Vol. 9 (11). 723. doi: 10.3390/agronomy9110723
10. Симонов А.В., Гордеева Е.И., Генаев М.А., Ли Вэньцзянь, Булатов И.О., Пшеничникова Т.А. Новый ген опушения листа *HL1th*, интрогрессированный в мягкую пшеницу от *Thinopyrum ponticum*, и его фенотипическое проявление при гомеологичных хромосомных замещениях // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024. Вып. 28, № 6. С. 602–609. doi: 10.18699/vjgb-24-67

References

1. Kaur J, Kariyat R. Role of trichomes in plant stress biology. *Evolutionary Ecology of Plant-Herbivore Interaction*. 2020;15-35. doi: 10.1007/978-3-030-46012-9_2
2. Hamaoka N, Yasui H, Yamagata Y, Inoue Y, Furuya N, Araki T, Ueno O, Yoshimura A. A hairy-leaf gene, BLANKET LEAF, of wild *Oryza nivara* increases photosynthetic water use efficiency in rice. *Rice*. 2017;10(1):1-11. doi: 10.1186/s12284-017-0158-1
3. Schreuder MDJ, Brewer CA, Heine C. Modelled Influences of Non-exchanging Trichomes on Leaf Boundary Layers and Gas Exchange. *Journal of Theoretical Biology*. 2001;210(1):23-32. doi: 10.1006/jtbi.2001.2285
4. Pshenichnikova TA, Doroshkov AV, Simonov AV, Afonnikov DA, Börner A. Diversity of leaf pubescence in bread wheat and relative species. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2017;64(7):1761-1773. doi: 10.1007/s10722-016-0471-3
5. Dobrovolskaya OB, Pshenichnikova TA, Arbuzova VS, Lohwasser U, Röder MS, Börner A. Molecular mapping of genes determining hairy leaf character in common wheat with respect to other species of the *Triticeae*. *Euphytica*. 2007;155:285-293. doi: 10.1007/s10681-006-9329-7
6. Osipova SV, Rudikovskiy AV, Permyakov AV, Rudikovskaya EG, Permyakova MD, Verkhoturor VV, Pshenichnikova TA. Physiological responses of wheat (*Triticum*

- aestivum* L.) lines with genetically different leaf pubescence to water deficiency. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(8):813-820. doi: 10.18699/VJ20.678.
7. Pshenichnikova TA, Doroshkov AV, Osipova SV, Permyakov AV, Permyakova MD, Efimov VM, Afonnikov DA. Quantitative characteristics of pubescence in wheat (*Triticum aestivum* L.) are associated with the parameters of gas exchange and chlorophyll fluorescence under conditions of normal and limited water supply. *Planta*. 2019;249(3):839-847. doi: 10.1007/s00425-018-3049-9
 8. Osipova SV, Permyakov AV, Permyakova MD, Pshenichnikova TA, Genaev MA., Börner A. The antioxidant enzymes activity in leaves of inter – varietal substitution lines of wheat (*Triticum aestivum* L.) with different tolerance to soil water deficit. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2013;5(8):2455-2465. doi: 10.1007/s11738-013-1280-3
 9. Gordeeva E, Badaeva E, Yudina R, Shchukina L, Shoeva O, Khlestkina E. Marker-assisted development of a blue-grained substitution line carrying the *Thinopyrum ponticum* chromosome 4Th(4D) in the spring bread wheat Saratovskaya 29 background. *Agronomy*. 2019;9(11):723. doi: 10.3390/agronomy9110723
 10. Simonov AV, Gordeeva EI, Genaev MA, Li Wenjian, Bulatov IO, Pshenichnikova TA. A new gene *H1th* for leaf pubescence introgressed into bread wheat from *Thinopyrum ponticum* and its phenotypic manifestation under homoeologous chromosomal substitutions. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(6):602-609. doi: 10.18699/vjgb-24-67

Информация об авторах:

Симонов Александр Владимирович, канд. биол. наук, н.с. Сектора генетики качества зерна ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия).

E-mail: sialexander@bionet.nsc.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6708-3822>

Гордеева Елена Ивановна, канд. биол. наук, н.с. Сектора функциональной генетики злаков ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия).

E-mail: elgordeeva@bionet.nsc.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3166-7409>

Осипова Светлана Владимировна, д-р биол. наук, СИФИБР СО РАН (Иркутск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7025-8590>

E-mail: svetlanaosipova2@mail.ru

Васенина Елея Юрьевна, лаборант-исследователь Сектора генетики качества зерна ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия).

Ли Вэньцзянь, аспирант Новосибирского государственного университета (Новосибирск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-4744-5002>

E-mail: liw562530@gmail.com

Пшеничникова Татьяна Алексеевна, доцент, канд. биол. наук, с.н.с., зав. сектором генетики качества зерна Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия).

E-mail: wheatpsh@bionet.nsc.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5639-916X>

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Information about the authors:

Alexander V. Simonov, Cand. Sci. (Biol.), Researcher at the Sector of quality, in the Institute of Cytology and Genetics SB RAS (Novosibirsk, Russia).

E-mail: sialexander@bionet.nsc.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6708-3822>

Elena I. Gordeeva, Cand. Sci. (Biol.), Researcher at the Sector of Functional Genetics of Cereals, in the Institute of Cytology and Genetics SB RAS (Novosibirsk, Russia).

E-mail: elgordeeva@bionet.nsc.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3166-7409>

Svetlana V. Osipova, Dr. Sci. (Biol.), leading researcher at the Laboratory of Physiological and Biochemical Adaptation of Plants, Institute SIPPB SB RAS (Irkutsk, Russia).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7025-8590>

E-mail: svetlanaosipova2@mail.ru

Leleya Yu. Vasinina, laboratory researcher of the sector of Genetics of Grain Quality in the Institute of Cytology and Genetics SB RAS

Wenjian Li, PhD student at Novosibirsk State University (Novosibirsk, Russia).

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-4744-5002>

E-mail: liw562530@gmail.com

Tatyana A. Pshenichnikova, Cand. Sci. (Biol.), Head of the sector of Genetics of Grain Quality in the Institute of Cytology and Genetics SB RAS (Novosibirsk, Russia).

E-mail: wheatpsh@bionet.nsc.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5639-916X>

The Authors declare no conflict of interest.

*Статья поступила в редакцию 25.08.2024;
одобрена после рецензирования 20.11.2024; принята к публикации 03.03.2025.*

*The article was submitted 25.08.2024;
approved after reviewing 20.11.2024; accepted for publication 03.03.2025.*

Научная статья

УДК 579.64

doi: 10.17223/19988591/69/19

Генетический ландшафт народов Алтая по гаплогруппам Y-хромосомы

Владимир Николаевич Харьков¹, Лариса Витальевна Валихова²,
Фаина Анисимовна Лузина³, Вадим Анатольевич Степанов⁴

^{1, 2, 4} НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, Томск, Россия

³ НИИ комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний,
Новокузнецк, Россия

¹ vladimir-kharkov@medgenetics.ru

Аннотация. Алтайцы в основном проживают на территории Республики Горный Алтай. Проведено исследование состава и частот гаплогрупп Y-хромосомы у северных и южных алтайцев. Описано распределение частот гаплогрупп Y-хромосомы у коренного населения Республики Алтай – северных алтайцев (кумандинцев, челканцев, тубаларов) и южных алтайцев (теленгитов и алтай-кижи) для подробной характеристики структуры их генофондов с помощью описания состава гаплогрупп Y-хромосомы и YSTR-гаплотипов, определяемых на основании генотипирования большого количества SNP и 44 YSTR-маркеров ее нерекombинирующей части. Для большинства алтайских народов характерно наличие различных вариантов гаплогруппы R1a1, но для каждой отдельной сублинии показано специфичное распределение по частотам у различных этносов. Варианты этой гаплогруппы связаны с расселением на территорию современной Южной Сибири тюркских племен. Геплотипы по разным гаплогруппам также достаточно сильно различаются в разных этнических выборках. Гаплогруппы Q1b1a1a1g~ (Y3951) и Q1b1a3b1a (Y1693) являются наследием аборигенных племен енисейской языковой семьи. Наличие гаплогруппы N1a2b1b1 (B478) в генофондах северных и южных алтайцев связано с аборигенным самодийским населением, которое проживало на этих территориях до прихода тюрков и монгольских племен. Полученные результаты состава и частот гаплогрупп Y-хромосомы свидетельствуют о смешении различных предковых групп. Гаплогруппы C2a1a2a2a (Y12825), C2a1a3a1c (Y12782), C2b1a1a1a1, N1a1a1a1a3a2 (B219) у алтай-кижи и теленгитов унаследованы от монгольских племен, переселившихся на территорию Алтая за последние сотни лет. Состав и частоты гаплогрупп между всеми исследованными этносами сильно различаются между ними. Это соответствует данным антропологов и этнографов, описывающих достаточно сложное этническое происхождение этих народов.

Ключевые слова: генофонд алтайцев, этногенез, Y-хромосома

Источник финансирования: работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-64-00060.

Для цитирования: Харьков В.Н., Валихова Л.В., Лузина Ф.А., Степанов В.А. Генетический ландшафт народов Алтая по гаплогруппам Y-хромосомы // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2025. № 69. С. 162–169. doi: 10.17223/19988591/69/19

Genetic landscape of the Altai peoples by Y-chromosome haplogroups

Vladimir N. Kharkov¹, Larisa V. Valikhova²,
Faina A. Luzina³, Vadim A. Stepanov⁴

^{1, 2, 4} *Research Institute of Medical Genetics Tomsk National Medical Research Center,
Tomsk, Russia*

³ *Research Institute for Complex Problems of Hygiene and Occupational Diseases,
Novokuznetsk, Russia*

¹ *vladimir-kharkov@medgenetics.ru*

Summary. The Altaians are a Turkic-speaking people who mainly live in the Altai Republic. They are divided into several ethnic groups. The number of northern Altaians is much smaller than the southern ones. Significant differences have been shown between them according to anthropological and linguistic data. The northern Altaians have the most pronounced shift towards the Uralians. They were formed as a result of the interaction of ancient Samoyedic, Ket, Ugric and Turkic tribes. The southern Altaians were formed due to the mixing of Turkic and Mongolian tribes. The material for the study was DNA samples of men belonging to different ethnic groups of the Altaians. The total sample of northern Altaian men was 139 people: Tubalars ($N = 99$), Chelkans ($N = 27$), Kumandins ($N = 13$). The sample of southern Altaians males consisted of 434 people: Telengits ($N = 99$) and Altai-Kizhi ($N = 335$). Using 386 SNP markers, the belonging to Y-chromosome haplogroups was determined. Analysis of STR haplotypes within haplogroups was carried out using 44 YSTRs (DYS19, 385a, 385b, 388, 389I, 389II, 390, 391, 392, 393, 426, 434, 435, 437, 438, 439, 442, 444, 445, 448, 449, 456, 458, 460, 461, 481, 504, 505, 518, 525, 531, 533, 537, 552, 570, 576, 635, 643, YCAIIa, YCAIIb, GATA H4.1, Y-GATA-A10, GGAAT1B07). The samples of northern and southern Altaians differ significantly in the composition and frequencies of Y-chromosome haplogroups. Haplogroup R1a1a1b2e1~ (YP1509) is completely dominant among Tubalars. Individual samples of Kumandins and Chelkans belonging to this haplogroup differ in haplotypes from Tubalars. This sublineage does not demonstrate a recent founder effect and a significant increase in the number of descendants of a common male ancestor over the past hundreds of years according to YSTR haplotypes. Some samples of Tubalars, Kumandins and Chelkans belong to the related haplogroup R1a1a1b2a2a3~ (Y42090). Among Tubalars, its frequency is 22%. These two haplogroups (R1a1a1b2e1~ and R1a1a1b2a2a3~) are the heritage of the Turkic peoples. Haplogroup Q1b1a1a1g~ (YP3951) is dominant in the Chelkans (63%) and forms a star-shaped phylogeny with a recent founder effect in the male line. Its two branches in the Chelkans, Kumandins and Tubalars are associated with the descendants of the local population of this region related to the peoples belonging to the Yeniseian language family. The Kumandins have the highest frequency of the R1b1a1a1a (M478) lineage, which was found in only one Altai-Kizhi man. The haplogroup R1a1a1 (YP1518) is dominant in frequency in the Telengits (58%), which is present with a very low frequency in the Altai-Kizhi. The dominance of this haplogroup is associated with the legacy of the ancient Turkic-speaking Tele tribes, who were not included in the Northern Altaians and Altai-Kizhi. The second most frequent (10%) haplogroup is N1a1a1a1a3a2 (B219), which is dominant among the eastern Buryats and is present among the Mongols and Tuvans. They also have haplogroup N1a2b1b1 (B478), which is inherited from the local Samoyed population, with a frequency of 6%. Their population samples from different villages differ in haplogroup frequency. The Altai-Kizhi are dominated by haplogroup R1a1a1b2a2a3b1a1~ (YP1542) (30%). Three more of their

haplogroups are predominant in the descendants of the early population of modern Mongolia - C2a1a2a2a (Y12825), C2a1a3a1c (Y12782), C2b1a1a1a1, N1a1a1a1a3a2 (B219) are present in many villages where the Altai-Kizhi live. Eighteen men from various villages belong to haplogroup Q1b1a3b1a (YP1693), which occupies 13% of the total sample of Tuvans. The southern Altaians have haplogroups D (15 samples) and J2b2b2 (Y18042) (18 samples). Nineteen men belong to the Samoyedic haplogroup N1a2b1b1 (B478), which makes up a small frequency in samples from different regions. Haplogroup J2b2b2 (Y18042) is associated with people from the territory of modern Iran and the Middle East. In this research we revealed that the most frequent sublineages of the Y chromosome among samples of the indigenous population of the Altai Mountains are variants of haplogroup R1a1, which are associated with various Turkic tribes that settled these territories and mixed with the local aboriginal population. They do not demonstrate a recent founder effect and significant demographic growth of these populations. A detailed study of the gene pool of all northern and southern Altaians by Y-chromosome haplogroups was conducted. The maximum multicomponent composition of the gene pool was found in the Altai-Kizhi. The Chelkans showed a founder effect in the male line over the past hundreds of years. Kumandins, Chelkans, Tubalars, Telengits and Altai-Kizhi are characterized by a specific composition and frequencies of haplogroups, the presence of which is associated with different ancestral groups of populations.

The paper contains 2 Figures, 9 References.

Keywords: gene pool of the Altai people, ehnogenesise, Y-chromosome

Fundings: This work was partially supported by grant of the Russian Science Foundation (No. 22-64-00060).

For citation: Kharkov VN, Valikhova LV, Luzina FA, Stepanov VA. Genetic landscape of the Altai peoples by Y-chromosome haplogroups. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2025;69:162-169. doi: 10.17223/19988591/69/19

Введение

Алтайцы – это тюркоязычные народы, которые в основном проживают на территории Республики Горный Алтай. Они разделяются на несколько этнических групп и различные рода по мужской линии. Численность северных алтайцев намного меньше, чем южных. Между ними показаны значительные различия по данным антропологии и лингвистики. Наиболее выраженный сдвиг в сторону уральцев имеют северные алтайцы [1, 2]. По классификации тюркских языков южные алтайцы отнесены к кыпчакской группе, часть диалектов северных алтайцев относится к уйгурской (северо-восточной) языковой группе [3, 4]. Северные алтайцы образовались в результате взаимодействия древних самодийских, кетских, угорских и тюркских племен. Южные алтайцы сформировались благодаря смешению тюркских и монгольских племен. В антропологическом отношении южные алтайцы относятся к южносибирскому и центральноазиатскому монголоидным типам, в то время как у северных алтайцев преобладает уральский антропологический тип [2, 5]. Целью работы является подробная характеристика всех народов Горного Алтая по SNP- и YSTR-маркерам Y-хромосомы для определения гаплогрупп и их различий между исследованными популяционными выборками.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили образцы ДНК мужчин, относящихся к разным этническим группам алтайцев. Общая выборка мужчин северных алтайцев составила 139 человек: тубалары ($N = 99$), челканцы ($N = 27$), кумандинцы ($N = 13$). Выборка мужчин южных алтайцев составила 434 человека: теленгиты ($N = 99$) и алтай-кижи ($N = 335$). Забор венозной крови у доноров проводили с соблюдением процедуры письменного информированного согласия на проведение исследования. На каждого донора составлялась анкета с его родословной, указанием этнической принадлежности и мест рождения предков. С помощью 386 SNP-маркеров была определена принадлежность к гаплогруппам. Классификация гаплогрупп дана в соответствии с данными Международного общества генетической генеалогии (сайт www.isogg.org). Анализ STR-гаплотипов внутри гаплогрупп проводили с использованием 44 микросателлитных маркеров нерекombинирующей части Y-хромосомы (YSTR) (DYS19, 385a, 385b, 388, 389I, 389II, 390, 391, 392, 393, 426, 434, 435, 437, 438, 439, 442, 444, 445, 448, 449, 456, 458, 460, 461, 481, 504, 505, 518, 525, 531, 533, 537, 552, 570, 576, 635, 643, YCAIIa, YCAIIb, GATA H4.1, Y-GATA-A10, GGAAT1B07). Генотипирование SNP-маркеров проводили с помощью ПЦР и последующего анализа фрагментов ДНК с применением ПДРФ. Генотипирование STR-маркеров проводилось с помощью капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе НАНОФОР 05. Построение медианных сетей гаплотипов Y-хромосомы проводили с использованием программы Network v 10.0.0.0 (Fluxus Technology Ltd.; www.fluxus-engineering.com) по методу медианных сетей Бандельта [6].

Результаты исследования и обсуждение

Выборки северных и южных алтайцев достаточно сильно отличаются по составу и частотам гаплогрупп Y-хромосомы. У тубаларов полностью доминирует гаплогруппа R1a1a1b2e1~ (YP1509). Отдельные образцы кумандинцев и челканцев, относящиеся к этой гаплогруппе, отличаются по гаплотипам от тубаларов. Эта сублиния по YSTR-гаплотипам не демонстрирует недавнего эффекта основателя и значительного роста числа потомков общего мужского предка за последние сотни лет. Часть образцов тубаларов, кумандинцев и челканцев относится к родственной ей гаплогруппе R1a1a1b2a2a3~ (Y42090). У тубаларов она составляет 22%. Эта гаплогруппа обнаружена лишь у двух мужчин алтай-кижи. Два варианта гаплогруппы R1a1 (R1a1a1b2e1~ и R1a1a1b2a2a3~) являются наследием тюркских народов.

Гаплогруппа Q1b1a1a1g~ (YP3951) доминирует у челканцев (63%) и образует звездообразную филогению с недавним эффектом основателя по мужской линии. Звездообразная медианная сеть этой гаплогруппы подтверждает изменение частот гаплогрупп у челканцев за несколько последних сотен лет за счет увеличения числа сыновей из поколения в поколение. Две ветви гаплогруппы Q1b1a1a1g~ у челканцев, кумандинцев и тубаларов свя-

заны с потомками местного населения этого региона, родственными народами, принадлежащим к енисейской языковой семье. У кумандинцев с максимальной частотой представлена линия R1b1a1a1a (M478), которая обнаружена лишь у одного мужчины алтай-кижи.

Максимальной по частоте у теленгитов является гаплогруппа R1a1a1 (Y1518) (58%), которая с очень небольшой частотой представлена у алтай-кижи (рис. 1). Доминирование этой гаплогруппы связано с наследием от древних тюркоязычных телесских племён, которые не вошли в состав северных алтайцев и алтай-кижи. Второй по частоте (10%) у них является гаплогруппа N1a1a1a1a3a2 (B219), которая доминирует у восточных бурят и присутствует у монголов и тувинцев. Доля этой гаплогруппы у теленгитов связана с вхождением в их состав ойратов из группы монгольских народов. С частотой 6% у них присутствует и гаплогруппа N1a2b1b1 (B478), которая унаследована от местного самодийского населения.

У алтай-кижи присутствуют различные гаплогруппы. Их популяционные выборки из разных поселков отличаются по частоте гаплогрупп. У алтай-кижи преобладает гаплогруппа R1a1a1b2a2a3b1a1~ (Y1542) (30%) (рис. 2). Еще три их гаплогруппы преобладающие у потомков раннего населения современной Монголии – C2a1a2a2a (Y12825), C2a1a3a1c (Y12782), C2b1a1a1a1, N1a1a1a1a3a2 (B219), присутствуют во многих поселках, где проживают алтай-кижи. Они с высокой частотой найдены у монголов, калмыков [7], бурят и тувинцев [8]. Их появление на территории Горного Алтая связано с приходом монгольских этнических групп. В Сибири наибольшая частота этих гаплогрупп выявлена у бурят. Эти гаплогруппы являются наследием наиболее позднего вклада монгольских переселенцев с территории современной Тувы и Монголии.

Восемнадцать мужчин из различных посёлков принадлежат к гаплогруппе Q1b1a3b1a (Y1693), которая занимает 13% в общей выборке тувинцев. Её максимальная частота в Туве приходится на восточные выборки тождинцев [9]. У этих южных алтайцев присутствуют гаплогруппы D (15 образцов), и J2b2b2 (Y18042) (18 образцов). Девятнадцать мужчин относятся к самодийской гаплогруппе N1a2b1b1 (B478), которая составляет небольшую частоту в выборках разных районов. Присутствие у северных и южных алтайцев с небольшой частотой гаплогруппы N1a2b1b1 подтверждает вклад в их генофонды коренного самодийского населения, проживавшего на этих территориях до прихода тюрков и монголов. У алтай-кижи присутствует и гаплогруппа J2b2b2 (Y18042) (17 образцов), которая связана с выходцами с территории современного Ирана и Ближнего Востока.

Наиболее частыми субиниями Y-хромосомы среди выборок коренного населения Горного Алтая являются варианты гаплогруппы R1a1, которые связаны с различными тюркскими племенами, заселившими эти территории и смешавшимися с местным аборигенным населением. Подробная структура гаплотипов этой гаплогруппы была установлена путем построения филогенетического древа по методу медианных сетей. Они не демонстрируют недавнего эффекта основателя и значительного демографического роста этих популяций. Проведено подробное изучение генофонда всех северных

и южных алтайцев по гаплогруппам Y-хромосомы. Максимальный многокомпонентный состав генофонда обнаружен у алтай-кижи. У челканцев показан эффект основателя по мужской линии за последние сотни лет. Кумандинцы, челканцы, тубалары, теленгиты и алтай-кижи характеризуются специфическим составом и частотами гаплогрупп, присутствие которых связано с разными предковыми группами популяций.

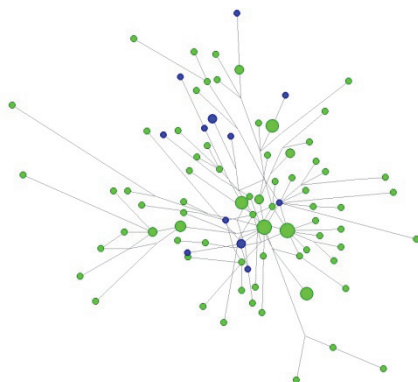


Рис. 1. Медианная сеть гаплогруппы R1a1a1 (YP1518);

зеленые – теленгиты, синие – алтай-кижи

[Fig. 1. Median haplogroup network R1a1a1 (YP1518); green are telengits, blue are altai-kizhi]

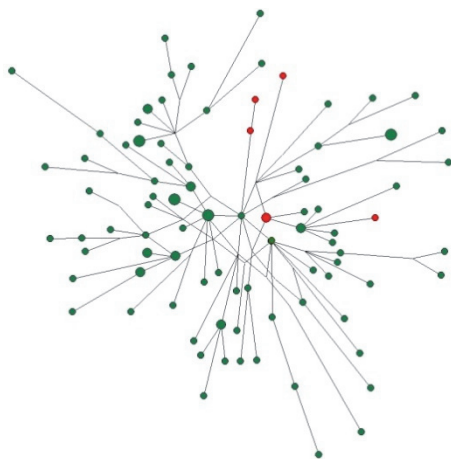


Рис. 2. Медианная сеть гаплогруппы R1a1a1b2a2a3b1a1~ R-YP1542;

зеленые – алтай-кижи, красные – тубалары

[Fig. 2. Median haplogroup network R1a1a1b2a2a3b1a1~ R-YP1542;

green are altai-kizhi, red are tubalars]

Заключение

Все исследованные этносы Горного Алтая сильно различаются по составу и частотам гаплогрупп Y-хромосомы. Полученные результаты свидетельствуют о смешении различных предковых групп, которые населяли эти территории в разные временные периоды, что согласуется с данными антропологии и этнологии. Частоты гаплогрупп и гаплотипов указывают на различие генофондов всех коренных алтайских народов.

Список источников

1. Моисеев В.Г. Антропологический состав тюркоязычных народов Западно-Сибирской равнины по краниологическим данным // Второй Международный конгресс этнографов и антропологов: резюме докладов и сообщений. Ч. 1. Уфа : Восточный ун-т, 1997. С. 57–58.
2. Алексеев В.П., Гохман И.И. Антропология азиатской части СССР. М. : Наука, 1984. 208 с.
3. Долгих Б.О. Родовой и племенной состав народов Сибири в XVII в. М. : Наука, 1960. 105 с.
4. Потапов Л.П. Этнический состав и происхождение алтайцев. Л. : Наука, 1969. 196 с.
5. Кацуба Д.В., Николаев Р.В. Этнография народов Сибири. Кемерово : Изд-во ОблИУУ, 1994. 204 с.
6. Bandelt H.-J., Forster P., Rohl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // *Molecular Biology and Evolution*. 1999. Vol. 16. PP. 37–48.
7. Balinova N., Post H., Kushniarevich A., Flores R., Karmin M., Sahakyan H., Reidla M., Metspalu E., Litvinov S., Dzhauhermezov M., Akhmetova V., Khusainova R., Endicott P., Khusnutdinova E., Orlova K., Bakaeva E., Khomyakova I., Spitsina N., Zinchenko R., Villem R., Rootsi S. Y-chromosomal analysis of clan structure of Kalmyks, the only European Mongol people, and their relationship to Oirat-Mongols of Inner Asia // *European Journal of Human Genetics*. 2019. Vol. 27, № 9. PP. 1466–1474.
8. Степанов В.А., Колесников Н.А., Валихова Л.В., Зарубин А.А., Хитринская И.Ю., Харьков В.Н. Структура и происхождение генофонда тувинцев по данным аутосомных SNP и гаплогрупп Y-хромосомы // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023. Т 27, № 1. С. 36–45.
9. Харьков В.Н., Хамина К.В., Медведева О.Ф., Симонова К.В., Хитринская И.Ю., Степанов В.А. Структура генофонда тувинцев по маркерам Y-хромосомы // *Генетика*. 2013. Т 49, № 12. С. 1416–1425.

References

1. Moiseev VG. Antropologicheskij sostav tyurkoyazychnyh narodov Zapadno-Sibirskoj ravniny po kranilogicheskim dannym [Anthropological composition of the Turkic-speaking peoples of the West Siberian Plain according to craniological data]. In: *Vtoroj mezhdunarodnyj kongress etnografov i antropologov: rezyume dokladov i soobshchenij. Ch. 1* [Second International Congress of Ethnographers and Anthropologists: Abstracts of Papers and Communications]. Ufa: Izd-vo Vostochnyj un-t; 1997. pp. 57-58. In Russian
2. Alekseev VP, Gohman II. Antropologiya aziatskoj chasti SSSR [Anthropology of the Asian part of the USSR]. Moscow: Nauka Publ.; 1984. 208 p. In Russian
3. Dolgiy BO. Rodovoj i plemennoj sostav narodov Sibiri v XVII v [The clan and tribal composition of the peoples of Siberia in the 17th century]. Moscow: Nauka Publ.; 1960. 105 p. In Russian
4. Potapov LP. Etnicheskij sostav i proiskhozhdenie altajcev [Ethnic composition and origin of the Altaians]. Leningrad: Nauka, Publ., 1969. 196 p. In Russian
5. Kacyuba DV, Nikolaev RV. Etnografiya narodov Sibiri [Ethnography of the peoples of Siberia]. Kemerovo: Izd-vo OblIUU, Publ., 1994. 204 p. In Russian
6. Bandelt H-J, Forster P, Rohl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 1999;16:37-48.
7. Balinova N, Post H, Kushniarevich A, Flores R, Karmin M, Sahakyan H, Reidla M, Metspalu E, Litvinov S, Dzhauhermezov M, Akhmetova V, Khusainova R, Endicott P, Khusnutdinova E, Orlova K, Bakaeva E, Khomyakova I, Spitsina N, Zinchenko R, Villem R, Rootsi S. Y-chromosomal analysis of clan structure of Kalmyks, the only European Mongol people, and their relationship to Oirat-Mongols of Inner Asia. *European Journal of Human Genetics*. 2019;27(9):1466-1474.

8. Stepanov VA, Kolesnikov NA, Valikhova LV, Zarubin AA, Khitrinskaya IYu, Kharkov VN. Structure and origin of Tuvan gene pool according to autosome SNP and Y-chromosome haplogroups. *Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(1):36-45. In Russian, English summary.
9. Kharkov VN, Khamina KV, Medvedeva OF, Simonova KV, Khitrinskaya IY, Stepanov VA. Gene Pool Structure of Tuvinians Inferred from Y-Chromosome Marker Data. *Genetika – Russian Journal of Genetics*. 2013;49(12):1236-1244. In Russian, English summary.

Информация об авторах:

Харьков Владимир Николаевич, д-р биол. наук, зав. лабораторией геномной идентификации, в.н.с. лаборатории эволюционной генетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (Томск, Россия).

ORCID: [https:// 0000-0002-1679-2212](https://0000-0002-1679-2212)

E-mail: vladimir-kharkov@medgenetics.ru

Валихова Лариса Витальевна, аспирант, м.н.с. лаборатории геномной идентификации НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (Томск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9440-1678>

Лузина Фаина Анисимовна, канд. биол. наук, с.н.с. лаборатории молекулярно-генетических и экспериментальных исследований НИИ комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний (Новокузнецк, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9299-4652>

E-mail: luzina45@mail.ru

Степанов Вадим Анатольевич, академик РАН, д-р биол. наук, директор Томского НИМЦ, руководитель лаборатории эволюционной генетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (Томск, Россия)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5166-331X>

E-mail: vadim-stepanov@medgenetics.ru

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Vladimir N. Kharkov, Dr. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Genomic Identification, Leading Researcher of the Laboratory of Evolutionary Genetics, Research Institute of Medical Genetics Tomsk National Medical Research Center (Tomsk, Russian Federation).

ORCID: [https:// 0000-0002-1679-2212](https://0000-0002-1679-2212)

E-mail: vladimir-kharkov@medgenetics.ru

Larisa V. Valikhova, graduate student, junior researcher at the Laboratory of Genomic Identification, Research Institute of Medical Genetics Tomsk National Medical Research Center (Tomsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9440-1678>

E-mail: larisa_ermizova9@mail.ru

Faina A. Luzina, Cand. Sci. (Biol.), senior researcher at the Laboratory of Molecular Genetics and Experimental Research, Research Institute for Complex Problems of Hygiene and Occupational Diseases (Novokuznetsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9299-4652>

E-mail: luzina45@mail.ru

Vadim A. Stepanov, Academician of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biol.), Director of the Tomsk National Research Center, Head of the Laboratory of Evolutionary Genetics, Research Institute of Medical Genetics Tomsk National Medical Research Center (Tomsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5166-331X>

E-mail: vadim-stepanov@medgenetics.ru

The Authors declare no conflict of interest.

*Статья поступила в редакцию 28.09.2024;
одобрена после рецензирования 18.11.2024; принята к публикации 03.03.2025.*

*The article was submitted 28.09.2024;
approved after reviewing 18.11.2024; accepted for publication 03.03.2025.*

Научная статья

УДК 575.86

doi: 10.17223/19988591/69/20

Томская школа эволюционной цитогенетики малярийных комаров

Игорь Валентинович Шарахов¹, Мария Владимировна Шарахова²

^{1,2} *Virginia Polytechnic and State University, Blacksburg, USA*

¹ *Национальный исследовательский Томский государственный университет,
Томск, Россия*

² *Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия*

¹ <https://orcid.org/0000-0003-0752-3747>, igor@vt.edu

² <https://orcid.org/0000-0002-5790-3548>, msharakh@vt.edu

Аннотация. Исследования по эволюционной цитогенетике малярийных комаров начались в Томском государственном университете в конце 1960-х гг. Первые исследования в области эволюционной цитогенетики малярийных комаров заложили основу для трех ключевых направлений. Первое направление посвящено изучению видового состава и филогенетических связей между разными видами, что позволяет выявить их эволюционные взаимоотношения и пути миграции. Второе направление исследует реорганизацию пространственной архитектуры генома в процессе онтогенеза и эволюции, что помогает понять, как изменения в структуре генома влияют на функции клеток и видообразование. Третье направление связано с популяционной и экологической генетикой, включая генетическую вариабельность популяций и их адаптацию к изменяющимся условиям среды. В статье даётся краткий обзор исследований по эволюционной цитогенетике малярийных комаров, начиная с первых работ по карiotипированию видов группы *Maculipennis* до геномного анализа разнообразных представителей рода *Anopheles* в настоящее время.

Ключевые слова: *Anopheles*, группа *Maculipennis*, архитектура генома, филогения, миграция видов, адаптация

Благодарности: авторы посвящают данную статью памяти Владимира Николаевича Стегния, основателя научной школы по изучению цитогенетических механизмов эволюции и адаптации природных популяций животных и растений в Томском государственном университете.

Для цитирования: Шарахов И.В., Шарахова М.В. Томская школа эволюционной цитогенетики малярийных комаров // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2025. № 69. С. 170–183. doi: 10.17223/19988591/69/20

Original article

doi: 10.17223/19988591/69/20

Tomsk school of evolutionary cytogenetics of malaria mosquitoes

Igor V. Sharakhov¹, Maria V. Sharakhova²

^{1,2} *Virginia Polytechnic and State University, Blacksburg, USA*

¹ *National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia*

² *Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

¹ <https://orcid.org/0000-0003-0752-3747>, igor@vt.edu

² <https://orcid.org/0000-0002-5790-3548>, msharakh@vt.edu

Summary. In this article we provide a brief overview of research in the main areas of evolutionary cytogenetics of malaria mosquitoes initiated in the 1960s at Tomsk State University. The threat of mass malaria in the Soviet Union was eliminated in the 1950s and 1960s. However, malaria mosquitoes were not destroyed and still remain potential or actual carriers of infectious diseases such as malaria and dirofilariasis. A great contribution to the study of the ecology of malaria mosquitoes in our country was made by the outstanding Russian zoologist and ecologist Vladimir Nikolaevich Beklemishev (1890-1962), who wrote the fundamental work "Ecology of the Malaria Mosquito" in 1944. In the 1950s and 1970s, the American zoologist James B. Kitzmiller (1918-1995) was very actively involved in the cytogenetics of malaria mosquitoes in North America. Using interspecific hybridization, he proved the relationship between the mosquito species of North America and Eurasia and the more ancient origin of the Nearctic group. Kitmiller's works clearly demonstrated the relevance and timeliness of studying the paleoarctic group of mosquitoes using cytogenetic methods. The ideological inspirer of conducting cytogenetic research at Tomsk University was Tatyana Semenovna Pestryakova (1909-1996), who headed the Department of Invertebrate Zoology at TSU from 1964 to 1974 and had previously studied the ecology of Siberian malaria mosquitoes. Work on the study of the chromosomes of malaria mosquitoes of the *Maculipennis* group began with the support and participation of the head of the Department of Cytology and Genetics of TSU Nadezhda Nikolaevna Kartashova (1907-1998). The first published works were devoted to the characterization of the karyotype of *Anopheles messeae* of the Middle Ob region and the cytogenetic identification of sibling species of malaria mosquitoes *An. maculipennis* and *An. messeae*. Vladimir Nikolaevich Stegny (1946-2023), together with Valentina Matveyevna Kabanova, was the first to use the cytogenetic method to describe a new species of mosquito - *An. beklemishevi* Stegny & Kabanova, 1976, named in honor of V. N. Beklemishev. Studying the chromosomes of different mosquito species at different stages of development, V.N. Stegny discovered that the spatial organization of chromosomes changes significantly during ontogenesis and speciation. It turned out that *An. messeae* has the largest range among the species of the *Maculipennis* group, covering almost the entire Boreal subregion of the Palearctic, and the greatest inversion polymorphism, which is a classic example of adaptive chromosomal polymorphism. The first works formed three main areas of research on the evolutionary cytogenetics of mosquitoes: 1) species composition and phylogenetic relationships of malaria mosquitoes; 2) reorganization of the spatial architecture of the malaria mosquito genome in ontogenesis and evolution; 3) population and ecological genetics of malaria mosquitoes. Reconstruction of the phylogenetic relationships of mosquito species is important for understanding how and when their genomes changed, and how this contributed to adaptation to new habitats and new pathogens, and also allows researchers to determine the geographical routes of migration and the order of speciation. The study established the geographic distribution,

reproductive relationships, and chromosomal phylogenetic relationships in the *Anopheles maculipennis* species group. It turned out that *An. beklemishevi* is closest to the Eurasian species and separated from them ~20 million years ago. Thus, the common ancestor of *An. beklemishevi* and other Eurasian species could have migrated from North America to Eurasia when the Bering Land Bridge existed. The main malaria carriers evolved independently of each other in the Maculipennis group. These data make it possible to approach the study of the molecular genetic basis of the ability of mosquitoes of different phylogenetic lineages to effectively transmit malaria. Studies on the evolutionary cytogenetics of malaria mosquitoes, initiated at Tomsk State University in the 1960s, played an important role in the development of this field of science. They made it possible to significantly advance the understanding of the species composition and phylogenetic relationships of malaria carriers and other diseases. Studies of the spatial organization of chromosomes have provided new insights into the regulation of genomic activity during cell differentiation and the mechanisms of genome architecture reorganization in evolution. These achievements provide a basis for further study of the mechanisms of speciation and adaptation of malaria mosquitoes to changing environmental conditions and interactions with pathogens.

The article contains 41 References.

Keywords: *Anopheles*, Maculipennis group, genome architecture, phylogeny, species migration, adaptation

Acknowledgments: The authors dedicate this article to the memory of Vladimir Nikolaevich Stegny, the founder of the scientific school for the study of cytogenetic mechanisms of evolution and adaptation of natural populations of animals and plants at Tomsk State University.

For citation: Sharakhov IV, Sharakhova MV. Tomsk school of evolutionary cytogenetics of malaria mosquitoes. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2025;69:170-183. doi: 10.17223/19988591/69/20

Введение

Несмотря на то, что в 1950–1960-х гг. угроза массового заболевания малярией в Советском Союзе была ликвидирована, малярийные комары до сих пор остаются потенциальными или действительными переносчиками инфекционных заболеваний, таких как малярия и дирофиляриоз. Большой вклад в изучение экологии малярийных комаров в нашей стране внес выдающийся русский зоолог и эколог Владимир Николаевич Беклемишев (1890–1962), написавший фундаментальный труд «Экология малярийного комара» в 1944 г. [1]. Генетические исследования комаров в 1940–1960-х гг. в СССР не проводились, поскольку генетика была под запретом. Хотя еще в 1940 г. Александр Сергеевич Серебровский впервые в мире предложил генетический метод уничтожения насекомых-вредителей при помощи массового выпуска самцов, несущих гомозиготные транслокации хромосом [2]. В 1950–1970-х гг. цитогенетикой малярийных комаров Северной Америки очень активно занимался американский зоолог Джеймс Б. Китцмиллер (1918–1995). При помощи межвидовой гибридизации он доказал родство между видами комаров Северной Америки и Евразии и выявил более древнее происхождение неарктической группы [3]. Работы Китцмиллера ясно

показали актуальность и своевременность изучения палеарктической группы комаров цитогенетическими методами.

Первые работы по цитогенетике комаров в Томском университете

Идейным вдохновителем проведения цитогенетических исследований в Томском университете стала Татьяна Семеновна Пестрякова (1909–1996), которая с 1964 по 1974 г. заведовала кафедрой зоологии беспозвоночных ТГУ и до этого сама занималась экологией малярийных комаров Сибири [4–5]. Работы по изучению хромосом малярийных комаров группы *Masulipennis* начались при поддержке и участии заведующей кафедрой цитологии и генетики ТГУ Надежды Николаевны Карташовой (1907–1998). Первые опубликованные работы были посвящены характеристике кариотипа *Anopheles messeae* Среднего Приобья [6] и цитогенетической идентификации видов-двойников малярийных комаров *An. maculipennis* и *An. messeae* [7]. Неожиданные открытия начались вскоре после начала исследований. Владимиром Николаевичем Стегнием (1946–2023) совместно с Валентиной Матвеевной Кабановой впервые цитогенетическим методом был описан новый вид комара – *An. beklemishevi* Stegny & Kabanova, 1976, названного в честь В.Н. Беклемишева [8]. Исследуя хромосомы разных видов комаров на различных стадиях развития, В.Н. Стегний обнаружил, что пространственная организация хромосом существенно меняется в онтогенезе и при видообразовании [9]. Выяснилось, что *An. messeae* среди видов группы *Masulipennis* имеет самый большой ареал, охватывающий почти всю Бореальную подобласть Палеарктики и наибольший инверсионный полиморфизм, который представляет классический пример адаптивного хромосомного полиморфизма [10]. Позже цитогенетические и экологические исследования популяций *An. messeae* позволили Юрию Михайловичу Новикову выделить две биологические формы (А и В) и предложить идею о наличии двух видов комаров [11]. Первые работы сформировали три главных направления исследований по эволюционной цитогенетике комаров: 1) видовой состав и филогенетические связи малярийных комаров; 2) реорганизация пространственной архитектуры генома малярийных комаров в онтогенезе и эволюции; 3) популяционная и экологическая генетика малярийных комаров. В 1998 г. Советом по грантам Президента Российской Федерации лаборатория В.Н. Стегния была признана ведущей научной школой по изучению цитогенетических механизмов эволюции и адаптации природных популяций животных и растений [12]. В.Н. Стегний возглавлял кафедру генетики и клеточной биологии ТГУ с 2002 по 2020 г. Ниже дан краткий обзор исследований по главным направлениям эволюционной цитогенетики малярийных комаров начиная с 1960-х гг. до настоящего времени.

Видовой состав и филогенетические связи малярийных комаров

Реконструкция филогенетических взаимоотношений видов комаров важна для понимания того, как и когда менялись их геномы и каким образом это способствовало приспособлению к новым условиям обитания и к новым

патогенам, а также позволяет определить географические пути миграции и порядок видообразования. В ходе исследований были установлены географическое распространение, репродуктивные взаимоотношения и хромосомные филогенетические связи в группе видов *Anopheles maculipennis* [13–15], однако возник вопрос о родственных взаимоотношениях *An. beklemishevi* с другими видами. Хромосомный анализ показал, что этот палеарктический вид имеет независимое от других палеарктических видов происхождение от неарктического вида *An. earlei*, который близок к другому неарктическому виду *An. freeborni* [16–17]. *Anopheles earlei* и *An. freeborni* обитают в западной части Североамериканского континента. В противоречие с этим на основе последовательностей внутреннего транскрибируемого спейсера 2 рибосомной ДНК (ITS2), *An. beklemishevi* был отнесен к подгруппе *Quadrimaculatus*, представители которого населяют восточную часть Северной Америки [18]. Также оставалось невыясненным время миграции комаров из Неарктики в Палеарктику. Предположительно миграция могла произойти либо через Гренландию, когда два континента были соединены, примерно 250–50 млн лет назад, либо через Берингов сухопутный мост, около 20–0,015 млн лет назад. Описание новых видов группы, таких как *An. artemievi* [19] и *An. persiensis* [20], добавило неопределенности в филогению *Maculipennis*. Кроме того, филогении, построенные на основе отдельных генетических локусов, противоречили схемам видообразования, построенным по данным цитогенетики, экологии и ареалогии [16–17, 20–21].

Полногеномное секвенирование, недавно проведенное для 11 палеарктических и двух неарктических видов, наконец позволило разработать калиброванное по времени филогенетическое древо на основе сравнения более 1 000 генов [22]. Данная работа установила родственные связи видов и предложила сценарий миграции группы *Maculipennis* через Берингов мост. Оказалось, что *An. beklemishevi* наиболее близок к евразийским видам и отделился от них ~20 млн лет назад. Таким образом, общий предок *An. beklemishevi* и остальных евразийских видов мог мигрировать из Северной Америки в Евразию, когда существовал Берингов мост. *Anopheles maculipennis*, *An. messeae* и *An. daciae* возникли на временном отрезке от восьми миллионов до двух миллионов лет назад и выработали способность к полной диапаузе независимо от *An. beklemishevi*. Главные переносчики малярии эволюционировали независимо друг от друга в группе *Maculipennis*. Эти данные позволяют подойти к изучению молекулярно-генетических основ способностей комаров разных филогенетических линий впадать в полную диапаузу или эффективно переносить малярию.

Реорганизация пространственной архитектуры генома малярийных комаров в онтогенезе и эволюции

Пространственная организация политенных хромосом изучалась в клетках слюнных желез личинок и питающих клетках яйчников взрослых особей малярийных комаров [9]. Возник вопрос о характеристиках пространственной реорганизации хромосом при дифференцировке типов клеток. Различаются ли клетки слюнных желез и питающие клетки яйчников по паттер-

нам прикреплений хромосом к ядерной оболочке и частотам межхромосомных контактов? Данные характеристики важны для регуляции экспрессии генов, поэтому ответ на этот вопрос может прояснить роль пространственной организации хромосом в тканеспецифичной функции генома комаров. Слюнные железы личинок специализируются на экспрессии генов с функциями иммунного ответа, смазке пищи и ротовой полости, метаболизме питательных веществ и детоксикации ксенобиотиков. Тогда как главная функция питающих клеток яичников – это синтез рибосом и мРНК многих генов для доставки их в растущий ооцит. При помощи четырехцветного олигопэинтинга политенных хромосом с разрешением 1 Мб удалось провести количественную оценку расстояний между хромосомными территориями и ядерной оболочкой у африканских видов малярийных комаров [23]. Оказалось, что процент хромосомных районов, расположенных на ядерной периферии, выше в клетках слюнных желез, чем в питающих клетках яичников. В то же время число межхромосомных контактов оказалось выше в питающих клетках яичников, чем в слюнных железах. Таким образом, была показана обратная связь между прикреплениями хромосом к ядерной оболочке и хромосом-хромосомными контактами при реорганизации пространственной архитектуры генома в онтогенезе. Можно заключить, что клетки слюнных желез и питающие клетки яичников различаются по паттернам прикреплений хромосом к ядерной оболочке и частотам межхромосомных контактов. Возможно, тканеспецифичные прикрепления хромосом к ядерной оболочке способствуют или, наоборот, предотвращают межхромосомные контакты, регулируя экспрессию генов в местах их совместной локализации.

Реорганизация пространственной архитектуры генома в эволюции была обнаружена только в питающих клетках яичников малярийных комаров [9]. Данные клетки являются сестринскими по отношению к ооциту или клетками зародышевого пути. Главной особенностью пространственной архитектуры генома в питающих клетках являются облигатные видоспецифичные прикрепления политенных хромосом к ядерной оболочке. Каковы молекулярно-цитогенетические характеристики районов прикрепления хромосом к ядерной оболочке? В одной из ранних работ было показано, что тяжёлый бета-гетерохроматин прикрепляют хромосомы к ядерной оболочке в питающих клетках яичников *An. messeae* [24]. Рыхлый (бета)гетерохроматин, но не компактный (альфа)гетерохроматин, прикрепляется к ядерной оболочке также в питающих клетках яичников африканских комаров [25]. Кроме того, антитело к мажорному белку ядерной оболочки – ламину – локализовалось в рыхлом гетерохроматине, который прикрепляется к оболочке ядра [26]. Интересно, что антитело к ламину локализовалось в районе 2bc X-хромосомы в питающих клетках яичников, где район 2bc прикреплен к оболочке, но не в слюнных железах, где он не связан с оболочкой, у *An. messeae* [27]. Выяснилось, что районы рыхлого прицентромерного и интеркалярного гетерохроматина значительно обогащены мобильными элементами [26]. Стоит отметить, что транспозоны могут обладать свойствами геномных районов связывания с архитектурно важными белками ядра [28]. Показано также, что гетерохроматин является быстро эволюционирующей

частью генома малярийных комаров [29]. В недавней работе изучалась пространственная архитектура геномов пяти видов *Anopheles* при помощи метода определения конформации хромосом Hi-C [30]. Анализ Hi-C карт выявил, что районы рыхлого прицентромерного и интеркалярного гетерохроматина взаимодействуют друг с другом, но не с эухроматином или компактным гетерохроматином. То есть облигатно прикрепляющийся к оболочке ядра гетерохроматин пространственно изолирован от других типов хроматина. Таким образом, молекулярно-цитогенетическими характеристиками районов облигатного прикрепления хромосом к ядерной оболочке являются рыхлая конформация гетерохроматина, обогащение транспозонами, взаимодействие с ламином и пространственная обособленность от других типов хроматина. По-видимому, вероятной причиной реорганизации трехмерной архитектуры генома при видообразовании является быстрая эволюция районов гетерохроматина, которые отвечают за прикрепление хромосом к ядерной оболочке.

Популяционная и экологическая генетика малярийных комаров

Anopheles messeae является самым географически широко распространенным и генетически разнообразным доминирующим переносчиком малярии в Евразии. Поэтому детальное знание генетики природных популяций *An. messeae* важно для разработки стратегий контроля инфекционных заболеваний человека, которые данный вид переносит. Этот вид имеет пять широко распространенных хромосомных инверсий [6]. Подробности полиморфизма инверсий в природных популяциях *An. messeae* интенсивно изучались в 1970–1990-х гг. [16]. Эти исследования выявили сложную структуру популяций *An. messeae* по всему ареалу вида, а также важную роль инверсий в климатической адаптации вида [10, 31]. Было выяснено, что частоты некоторых комбинаций инверсий были выше или ниже ожидаемых при случайном скрещивании, что свидетельствовало о наличии неравновесия по сцеплению между ними. На основе этих данных Ю.М. Новиковым и В.М. Кабановой была выдвинута гипотеза о том, что комбинации различных инверсий в природных популяциях *An. messeae* приводят к существованию двух хромосомных комплексов [32]. Дальнейшие исследования выявили, что комары из разных хромосомных комплексов различаются по плодовитости самок [33], рациону личинок [34], чувствительности к токсинам *Bacillus thuringiensis* [35] и акустическим сигналам при спаривании [36]. Эти хромосомные комплексы были выделены в криптические генетически изолированные формы, названные «А» и «В» [11, 37]. В 2004 г. независимо от этих исследований новый вид *An. daciae* был выделен из *An. messeae* на основе пяти нуклеотидных замен ITS2 рДНК и морфологических различий на стадии яйца [38]. Проведенное позже секвенирование ITS2 рДНК показало, что хромосомная форма «А» является синонимом *An. daciae* [39]. Таким образом, выявленные отличия между двумя так называемыми хромосомными формами были связаны с наличием двух прежде не идентифицированных видов комаров.

Недавно на основе частот 11 полиморфных хромосомных инверсий, используемых в качестве генетических маркеров, был проведен крупномасштабный популяционно-генетический анализ 1 932 комаров, идентифицированных как *An. messeae*, *An. daciae* и их гибриды с помощью секвенирования ITS2 рДНК и кариотипирования [40]. Наибольшие генетические различия между видами были обнаружены в половой хромосоме X, что предполагает потенциальное участие этой хромосомы в видообразовании. Интересно, что два района X-хромосомы, которые инвертированы у *An. messeae* по сравнению с *An. atroparvus*, обогащены генами, участвующими в регуляции активности иммунной системы и рецепторов нейромедиаторов [41]. Была предложена гипотеза о том, что оледенения в Евразии могли способствовать первоначальному расхождению видов *An. messeae* и *An. daciae* [40]. Исследование показало, что *An. messeae* имеет гораздо большее разнообразие и более сложную популяционную структуру, чем *An. daciae*. Это свидетельствует о том, что *An. messeae* заселил Восточную Евразию раньше, чем *An. daciae*. Интересно, что частоты встречаемости гибридов низки (~1%) в Северной Европе, но высоки (до 50%) в юго-восточных популяциях, что требует дальнейшего изучения.

Заключение

Исследования по эволюционной цитогенетике малярийных комаров, начатые в Томском государственном университете в 1960-х гг., сыграли важную роль в развитии этой области науки. Они позволили значительно продвинуть понимание видового состава и филогенетических связей переносчиков малярии и других заболеваний. Исследования пространственной организации хромосом дали новые представления о регуляции геномной активности в процессе дифференцировки клеток и механизмах реорганизации архитектуры генома в эволюции. Эти достижения обеспечили базу для дальнейшего изучения механизмов видообразования и адаптации малярийных комаров к меняющимся условиям среды и взаимодействия с патогенами.

Список источников

1. Беклемишев В.Н. Экология малярийного комара. М. : Медгиз, 1944. 299 с.
2. Серебровский А.С. О новом возможном методе борьбы с вредными насекомыми // Зоологический журнал. 1940. Т. 19, № 4. С. 618–630.
3. Kitzmiller J.B., Frizzi G., Baker R.H. Evolution and speciation within the Maculipennis complex of the genus *Anopheles* / eds J.W. Wright, R. Pal. Amsterdam : Elsevier Publ., 1967. PP. 151–210.
4. Пестрякова Т.С. Закономерности поля тяготения анофелес в связи с биологическими предпосылками эпидемиологии и профилактики малярии : автореф. дис. ... канд. биол. наук. Томск, 1955. 17 с.
5. Пестрякова Т.С. Возрастной состав перезимовавших и летних генераций анофелес в нетронутой популяции и после применения дуста в поле тяготения // Вопросы теоретической и клинической медицины: Научные труды НГМИ. 1959. Т. 23.
6. Кабанова В.М., Карташова Н.Н., Стегний В.Н. Кариологическое исследование природных популяций малярийного комара в Среднем Приобье. I. Характеристика кариотипа *Anopheles maculipennis messeae* // Цитология. 1972. Т. 14, № 5. С. 613–636.

7. Стегний В.Н., Пестрякова Т.С., Кабанова В.М. Цитогенетическая идентификация видов-двойников малярийного комара *Anopheles maculipennis* и *Anopheles messeae* (Diptera, Culicidae) // Зоологический журнал. 1973. Т. 52, № 11. С. 1671–1676.
8. Стегний В.Н., Кабанова В.М. Цитозологическое изучение природных популяций малярийного комара на территории СССР. Сообщение I: Выделение нового вида *Anopheles* в комплексе *Maculipennis* методом цитодиагностики // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 1976. Т. 65, № 2. С. 192–198.
9. Стегний В.Н. Реорганизация структуры интерфазных ядер в онто- и филогенезе малярийных комаров // Доклады Академии наук СССР. 1979. Т. 249, № 5. С. 1231–1234.
10. Стегний В.Н., Кабанова В.М., Новиков Ю.М., Плешкова Г.Н. Инверсионный полиморфизм малярийного комара *Anopheles messeae*. Сообщение I: Распространение инверсий по ареалу вида // Генетика. 1976. Т. 12, № 4. С. 47–55.
11. Новиков Ю.М. *Anopheles messeae* Fall. (Diptera, Culicidae) – два вида *in statu nascendi* // Макроэволюция : материалы 1 Всесоюз. конф. по проблемам эволюции. М. : Наука, 1984. 67 с.
12. Ведущие научные школы России. Справочник. М. : Янус-К, 1998. 624 с.
13. Стегний В.Н., Новиков Ю.М., Кабанова В.М. Цитогенетический анализ и распространение малярийного комара *Anopheles beklemishevi* // Зоологический журнал. 1978. Т. 57, № 6. С. 871–876.
14. Стегний В.Н. Репродуктивные взаимоотношения малярийных комаров *Anopheles* комплекса *Maculipennis* // Зоологический журнал. 1980. Т. 59, № 10. С. 1469–1476.
15. Стегний В.Н. Генетические основы эволюции малярийных комаров *Anopheles* комплекса *Maculipennis* (Diptera, Culicidae). I. Хромосомные филогенетические связи // Зоологический журнал. 1981. Т. 60, № 1. С. 69.
16. Стегний В.Н. Популяционная генетика и эволюция малярийных комаров. Томск : Издательский Дом Томского государственного университета, 1991. 137 с.
17. Стегний В.Н. Генетика сальтационного видообразования и системные мутации. Томск : Издательский Дом Томского государственного университета, 2019. 264 с.
18. Harbach R.E. The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships // Bull Entomol Res. 2004. Vol. 94, № 6. PP. 537–553. doi: 10.1079/ber2004321
19. Гордеев М.И., Званцов А.Б., Горячева И.И., Шайкевич Е.В., Ежов М.Н. Описание нового вида *Anopheles artemievi* sp.n. (Diptera, Culicidae) // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2005. № 2. С. 4–5.
20. Djadid N.D., Gholizadeh S., Tafsiiri E., Romi R., Gordeev M., Zakeri S. Molecular identification of Palearctic members of *Anopheles maculipennis* in northern Iran // Malaria journal. 2007. Vol. 6, № 6. doi:10.1186/1475-2875-6-6
21. Ваулин О.В., Новиков Ю.М. Филогенетические связи между палеарктическими видами *Anopheles* комплекса *Maculipennis* (Diptera: Culicidae), установленные при использовании разных методов. Проблема консенсуса // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016. Т. 20, №5. С. 695–703. doi: 10.18699/VJ16.189
22. Yurchenko A.A., Naumenko A.N., Artemov G.N., Karagodin D.A., Hodge J.M., Velichevskaya A.I., Kokhanenko A.A., Bondarenko S.M., Abai M.R., Kamali M., Gordeev M.I., Moskaev A.V., Caputo B., Aghayan S.A., Baricheva E.M., Stegny V.N., Sharakhova M.V., Sharakhov I.V. Phylogenomics revealed migration routes and adaptive radiation timing of Holarctic malaria mosquito species of the *Maculipennis* group // BMC Biol. 2023. Vol. 21, № 1. P. 63. doi: 10.1186/s12915-023-01538-w
23. George P., Kinney N.A., Liang J., Onufriev A.V., Sharakhov I.V. Three-dimensional organization of polytene chromosomes in somatic and germline tissues of malaria mosquitoes // Cells. 2020. Vol. 9, № 2. P. 339. doi: 10.3390/cells9020339
24. Стегний В.Н., Шарахова М.В. Системная реорганизация архитектоники политенных хромосом в онто- и филогенезе малярийных комаров. Структурные особенности зон прикрепления хромосом к ядерной оболочке // Генетика. 1991. Т. 27, № 5. С. 828–835.

25. Sharakhov I.V., Sharakhova M.V., Mbogo C.M., Koekemoer L.L., Yan G. Linear and spatial organization of polytene chromosomes of the African malaria mosquito *Anopheles funestus* // Genetics. 2001. Vol. 159, № 1. PP. 211–218. doi: 10.1093/genetics/159.1.211
26. Sharakhova M.V., George P., Brusentsova I.V., Leman S.C., Bailey J.A., Smith C.D., Sharakhov I.V. Genome mapping and characterization of the *Anopheles gambiae* heterochromatin // BMC Genomics. 2010. Vol. 11. doi: 10.1186/1471-2164-11-459
27. Artemov G., Bondarenko S., Sapunov G., Stegnyy V. Tissue-specific differences in the spatial interposition of X chromosome and 3R chromosome regions in the malaria mosquito *Anopheles messeae* Fall // PLoS One. 2015. Vol. 10, № 2. e0115281. doi: 10.1371/journal.pone.0115281
28. Pathak R.U., Phanindhar K., Mishra R.K. Transposable elements as scaffold/matrix attachment regions: shaping organization and functions in genomes // Frontiers in molecular biosciences. 2024. Vol.10. 1326933 p. doi: 10.3389/fmolb.2023.1326933
29. Sharma A., Kinney N.A., Timoshevskiy V.A., Sharakhova M.V., Sharakhov I.V. Structural variation of the X chromosome heterochromatin in the *Anopheles gambiae* complex // Genes. 2020. Vol. 11, № 3. doi: 10.3390/genes11030327
30. Lukyanchikova V., Nuriddinov M., Belokopytova P., Taskina A., Liang J., Reijnders M.J.M.F., Ruzzante L., Feron R., Waterhouse R.M., Wu Y., Mao C., Tu Z., Sharakhov I.V., Fishman V. *Anopheles* mosquitoes reveal new principles of 3D genome organization in insects. Nature communications. 2022. Vol. 13, № 1. doi: 10.1038/s41467-022-29599-5
31. Москаев А.В., Гордеев М.И., Маслова Л.А. Кариотипическая структура популяций малярийных комаров в северных и восточных районах Московской области // Вестник Московского государственного областного университета. Серия: Естественные науки. 2016. № 1. С. 36–49. doi: 0.18384/2310-7189-2016-1-36-49
32. Новиков Ю.М., Кабанова В.М. Адаптивная ассоциация инверсий в природной популяции малярийного комара *Anopheles messeae* Fall. // Генетика. 1979. Т. 15, № 6. 1033.
33. Гордеев М.И., Стегний В.Н. Инверсионный полиморфизм малярийного комара *Anopheles messeae*. Сообщение VII: Плодовитость и популяционно-генетическая структура вида // Генетика. 1987. Т. 23, № 12. С. 2169–2174.
34. Гордеев М.И., Трошков Н.Ю. Инверсионный полиморфизм малярийного комара *Anopheles messeae*. Сообщение IX. Каннибализм у личинок как фактор отбора // Генетика. 1990. Т. 26, № 9. С. 1597–1603.
35. Гордеев М.И., Бурлак В.А. Инверсионный полиморфизм малярийного комара *Anopheles messeae*. Сообщение X: Устойчивость личинок с разными генотипами к токсинам кристаллообразующей бактерии *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (серovar H14) // Генетика. 1991. Т. 27, № 2. С. 238–246.
36. Перевозкин В.П., Принцева А.А., Масленников П.В., Бондарчук С.С. Генетические аспекты полового поведения малярийных комаров на базе специфических акустических сигналов при спаривании // Генетика. 2012. Т. 48, № 6. С. 692–697.
37. Новиков Ю.М., Шевченко А.И. Инверсионный полиморфизм и дивергенция двух криптических форм таксона *Anopheles messeae* (Diptera, Culicidae) на уровне повторяющихся элементов геномной ДНК // Генетика. 2001. Т. 37, № 7. С. 915–925.
38. Nicolescu G., Linton Y.M., Vladimirescu A., Howard T.M., Harbach R.E. Mosquitoes of the *Anopheles maculipennis* group (Diptera: Culicidae) in Romania, with the discovery and formal recognition of a new species based on molecular and morphological evidence // Bulletin of entomological research. 2004. Vol. 94. PP. 525–535. doi: 10.1079/ber2004330
39. Ваулин О.В., Новиков Ю.М. Полиморфизм и межвидовая изменчивость нуклеотидной последовательности гена субъединицы и цитохромоксидазы (COI) у видов-двойников А и В *Anopheles messeae* и *An. beklemishevi* (Diptera: Culicidae) // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2012. Т. 16, № 2. С. 358–368.
40. Brusentsov I.I., Gordeev M.I., Yurchenko A.A., Karagodin D.A., Moskaev A.V., Hodge J.M., Burlak V.A., Artemov G.N., Sibataev A.K., Becker N., Sharakhov I.V., Baricheva E.M., Sharakhova M.V. Patterns of genetic differentiation imply distinct phylogeographic history of the mosquito species *Anopheles messeae* and *Anopheles daciae* in

Eurasia // Molecular ecology. 2023. Vol. 32, № 20. PP. 5609–5625. doi: 10.1111/mec.17127

41. Soboleva E.S., Kirilenko K.M., Fedorova V.S., Kokhanenko A.A., Artemov G.N., Sharakhov I.V. Two Nested Inversions in the X Chromosome Differentiate the Dominant Malaria Vectors in Europe, *Anopheles atroparvus* and *Anopheles messeae* // Insects. 2024. Vol. 15, № 5. doi: 10.3390/insects15050312

References

1. Beklemishev VN. Ekologiya malyariynogo komara [Ecology of the *Anopheles* mosquito]. Moscow: Medgiz; 1944. 299 p. In Russian.
2. Serebrovskii AS. On the possibility of a new method for the control of insect pests. *Zoologicheskii zhurnal*. 1940;19(4):618-630
3. Kitzmiller JB, Frizzi G, Baker RH. Evolution and speciation within the *Maculipennis* complex of the genus *Anopheles*. Wright JW, Pal R, editors. Amsterdam: Elsevier Publ.; 1967. pp. 151-210.
4. Pestryakova TS. *Zakonomernosti polya tyagoteniya anofeles v svyazi s biologicheskimi predposylkami epidemiologii i profilaktiki malyarii* [Patterns of the gravitational field of *Anopheles* in relation to the biological prerequisites for epidemiology and malaria prevention] [CandSci. Dissertation Abstract, Biology]. Tomsk: Tomsk State University; 1955. 17 p. In Russian.
5. Pestryakova TS. Vozrastnoi sostav perezimovavshikh i letnikh generatsii anofeles v netronutoi populyatsii i posle primeneniya dusta v pole tyagoteniya [Age composition of overwintered and summer generations of *Anopheles* in an untouched population and after applying dust in the gravitational field]. *Vopr Teoret Klin Med*. 1959;23. In Russian.
6. Kabanova VM, Kartashova NN, Stegnyy VN. Karyological investigation of natural population of the malarial mosquitoes in the middle Ob-river I. Characteristics of the karyotype of *Anopheles maculipennis messeae* Fall. (Diptera: Culicidae). *Tsitologiya*. 1972;14(5):613-636. In Russian, English summary
7. Stegnyy VN, Pestryakova TS, Kabanova VM. Cytogenetic identification of sibling species *Anopheles maculipennis* and *An. messeae* (Diptera, Culicidae). *Zoologicheskii zhurnal*. 1973;52(11):1671-1676. In Russian, English summary
8. Stegnyy VN, Kabanova VM. Cytoecological study of malaria mosquito population forecast in the USSR. Report I. Isolation of a new species of *Anopheles* in the *Maculipennis* complex by cytodiagnosics. *Meditinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni*. 1976;65(2):192-198. In Russian, English summary
9. Stegnyy VN. Reorganizatsiya struktury interfaznykh yader v onto- i filogeneze malyariynykh komarov [Reorganization of the structure of interphase nuclei in the ontogenesis and phylogenesis of malaria mosquitoes]. *Doklady AN SSSR*. 1979;249(5):1231-1234. In Russian.
10. Stegnyy VN, Kabanova VM, Novikov YuM, Pleshkov GN. Inversion polymorphism in *Anopheles messeae*. I. Distribution of inversions over the area of the species. *Genetika*. 1976;12(4):47-55. In Russian, English summary
11. Novikov YuM. *Anopheles messeae* Fall. (Diptera, Culicidae) – dva vida in statu nascendi [*Anopheles messeae* Fall. (Diptera, Culicidae) - two species in statu nascendi]. In: *Makroevolyutsiya*. Materialy nauch. konf. [Macroevolution. Proc. 1 All-Union Conf. on Evolution Problems]. Moscow: Nauka Publ.; 1984. 67 p. In Russian.
12. Vedushchie nauchnye shkoly Rossii. Spravochnik [Leading scientific schools of Russia: Directory]. Moscow: Janus-K Publ.; 1998. 624 p. In Russian.
13. Stegnyy VN, Novikov YuM, Kabanova VM. Cytogenetic analysis and distribution of *Anopheles beklemishevi*. *Zoologicheskii zhurnal*. 1978;57(6):871-876. In Russian, English summary

14. Stegnyy VN. Reproductive interrelations of malaria mosquitoes of the complex *Anopheles maculipennis* (Diptera, Culicidae). *Zoologicheskii zhurnal*. 1980;59(10):1469-1476. In Russian, English summary
15. Stegnyy VN. Genetical foundations of evolution of the malarial mosquitoes *Anopheles maculipennis* complex (Diptera, Culicidae). 1. Chromosomal phylogenetic relations. *Zoologicheskii zhurnal*. 1981;60(1):69. In Russian, English summary
16. Stegnyy VN. Populyatsionnaya genetika i evolyutsiya malyariynykh komarov [Population genetics and evolution of malaria mosquitoes]. Tomsk: Izdatel'skii Dom Tomskogo gosudarstvennogo universiteta Publ.; 1991. 137 p. In Russian.
17. Stegnyy VN. Genetika saltatsionnogo vidoobrazovaniya i sistemnye mutatsii [Genetics of saltational speciation and systemic mutations]. Tomsk: Izdatel'skii Dom Tomskogo gosudarstvennogo universiteta Publ.; 2019. 264 p. In Russian.
18. Harbach RE. The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bull Entomol Res*. 2004;94(6):537-553. doi: 10.1079/ber2004321
19. Gordeev MI, Zvantsev AB, Goryacheva II, Shaikevich EV, Ezhov MN. Description of the new species *Anopheles artemievi* sp.n. (Diptera, Culicidae). *Meditinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni*. 2005;(2):4-5. In Russian, English summary
20. Djadid ND, Gholizadeh S, Tafsiri E, Romi R, Gordeev M, Zakeri S. Molecular identification of Palearctic members of *Anopheles maculipennis* in northern Iran. *Malar J*. 2007;6:6. doi: 10.1186/1475-2875-6-6
21. Vaulin OV, Novikov YuM. Phylogenetic relationships between Palearctic species of the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) revealed by different approaches and markers. The problem of consensus. *Vavilovskii zhurnal genetiki i seleksii*. 2016;20(5):695-703. In Russian, English summary doi: 10.18699/VJ16.189
22. Yurchenko AA, Naumenko AN, Artemov GN, Karagodin DA, Hodge JM, Velichevskaya AI, Kokhanenko AA, Bondarenko SM, Abai MR, Kamali M, Gordeev MI, Moskaev AV, Caputo B, Aghayan SA, Baricheva EM, Stegnyy VN, Sharakhova MV, Sharakhov IV. Phylogenomics revealed migration routes and adaptive radiation timing of Holarctic malaria mosquito species of the Maculipennis group. *BMC Biol*. 2023;21(1):63. doi: 10.1186/s12915-023-01538-w
23. George P, Kinney NA, Liang J, Onufriev AV, Sharakhov IV. Three-dimensional organization of polytene chromosomes in somatic and germline tissues of malaria mosquitoes. *Cells*. 2020;9(2):339. doi: 10.3390/cells9020339
24. Stegnyy VN, Sharakhova MV. Systemic reorganization of polytene chromosomes architecture in the ontogenesis and phylogenesis of malaria mosquitoes. *Genetika*. 1991;27(5):828-835. In Russian, English summary
25. Sharakhov IV, Sharakhova MV, Mbogo CM, Koekemoer LL, Yan G. Linear and spatial organization of polytene chromosomes of the African malaria mosquito *Anopheles funestus*. *Genetics*. 2001;159(1):211-218. doi: 10.1093/genetics/159.1.211
26. Sharakhova MV, George P, Brusentsova IV, Leman SC, Bailey JA, Smith CD, Sharakhov IV. Genome mapping and characterization of the *Anopheles gambiae* heterochromatin. *BMC Genomics*. 2010;11:459. doi: 10.1186/1471-2164-11-459
27. Artemov G, Bondarenko S, Sapunov G, Stegnyy V. Tissue-specific differences in the spatial interposition of X chromosome and 3R chromosome regions in the malaria mosquito *Anopheles messeae* Fall. *PLoS One*. 2015;10(2). doi: 10.1371/journal.pone.0115281
28. Pathak RU, Phanindhar K, Mishra RK. Transposable elements as scaffold/matrix attachment regions: shaping organization and functions in genomes. *Front Mol Biosci*. 2024;10:1326933. doi: 10.3389/fmolb.2023.1326933
29. Sharma A, Kinney NA, Timoshevskiy VA, Sharakhova MV, Sharakhov IV. Structural variation of the X chromosome heterochromatin in the *Anopheles gambiae* complex. *Genes*. 2020;11(3):327. doi: 10.3390/genes11030327
30. Lukyanchikova V, Nuriddinov M, Belokopytova P, Taskina A, Liang J, Reijnders MJMF, Ruzzante L, Feron R, Waterhouse RM, Wu Y, Mao C, Tu Z, Sharakhov IV, Fishman V.

- Anopheles* mosquitoes reveal new principles of 3D genome organization in insects. *Nat Commun.* 2022;13(1):1960. doi: 10.1038/s41467-022-29599-5
31. Moskaev AV, Gordeev MI, Maslova LA. Karyotypic structure of populations of malaria mosquitoes in the northern and eastern sectors of the Moscow region. *Bulletin of Moscow State Regional University. Series: Natural sciences.* 2016;(1):36-49. doi: 0.18384/2310-7189-2016-1-36-49
 32. Novikov YuM, Kabanova VM. Adaptive association of inversions in the natural population of malaria mosquito *Anopheles messeae* Fall. *Genetika.* 1979;15(6):1033. In Russian, English summary
 33. Gordeev MI, Stegnyy VN. Inversion polymorphism of malaria mosquito *Anopheles messeae*. VII. Fertility and population-genetic structure. *Genetika.* 1987;23(12):2169-2174. In Russian, English summary
 34. Gordeev MI, Troshkov NYu. Inversion polymorphism in malaria mosquito *Anopheles messeae*. IX. Cannibalism in larvae as a factor of selection. *Genetika.* 1990;26(9):1597-1603. In Russian, English summary
 35. Gordeev MI, Burlak VA. Inversion polymorphism in malaria mosquito *Anopheles messeae*. X. Insensibility of larvae with different genotypes to toxins of crystal-forming bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (serovar H14). *Genetika.* 1991;27(2):238-246. In Russian, English summary
 36. Perevozkin VP, Printseva AA, Maslennikov PV, Bondarchuk SS. Genetic aspects of sexual behavior in malaria mosquitoes on the basis of specific acoustic signals at mating. *Genetika.* 2012;48(6):692-697. In Russian, English summary
 37. Novikov YuM, Shevchenko AI. Inversion polymorphism and divergence of two cryptic forms of the taxon *Anopheles messeae* at the level of repetitive DNA elements. *Genetika.* 2001;37(7):915-925. In Russian, English summary
 38. Nicolescu G, Linton YM, Vladimirescu A, Howard TM, Harbach RE. Mosquitoes of the *Anopheles maculipennis* group (Diptera: Culicidae) in Romania, with the discovery and formal recognition of a new species based on molecular and morphological evidence. *Bull Entomol Res.* 2004;94(6):525-535. doi: 10.1079/ber2004330
 39. Vaulin OV, Novikov YuM. Polymorphism and interspecific variability of cytochrome oxidase subunit I (COI) gene nucleotide sequence in sibling species of A and B *Anopheles messeae* and *An. beklemishevi* (Diptera: Culicidae). *Vavilovskii zhurnal genetiki i selektsii.* 2012;16(2):358-368. In Russian, English summary
 40. Brusentsov II, Gordeev MI, Yurchenko AA, Karagodin DA, Moskaev AV, Hodge JM, Burlak VA, Artemov GN, Sibataev AK, Becker N, Sharakhov IV, Baricheva EM, Sharakhova MV. Patterns of genetic differentiation imply distinct phylogeographic history of the mosquito species *Anopheles messeae* and *Anopheles daciae* in Eurasia. *Mol Ecol.* 2023;32(20):5609-5625. doi: 10.1111/mec.17127
 41. Soboleva ES, Kirilenko KM, Fedorova VS, Kokhanenko AA, Artemov GN, Sharakhov IV. Two nested inversions in the X chromosome differentiate the dominant malaria vectors in Europe, *Anopheles atroparvus* and *Anopheles messeae*. *Insects.* 2024;15(5):312. doi: 10.3390/insects15050312

Информация об авторах:

Шарахов Игорь Валентинович, профессор кафедры энтомологии Политехнического университета Вирджинии (Блэксбург, США); д-р биол. наук, профессор кафедры генетики и клеточной биологии Томского государственного университета (Томск, Россия).
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0752-3747>

E-mail: igor@vt.edu; igor@mail.tsu.ru

Шарахова Мария Владимировна, доцент кафедры энтомологии Политехнического университета Вирджинии (Блэксбург, США); канд. биол. наук, н.с. лаборатории механизмов клеточной дифференциации Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5790-3548>

E-mail: msharakh@vt.edu

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Information about the authors:

Igor V. Sharakhov, Professor, Department of Entomology, Virginia Tech University (Blacksburg, USA); D.Sc. (Biol.), Professor, Department of Genetics and Cell Biology, Tomsk State University (Tomsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0752-3747>

E-mail: igor@vt.edu; igor@mail.tsu.ru

Maria V. Sharakhova, Associate Professor, Department of Entomology, Virginia Tech University (Blacksburg, USA); Cand.Sci. (Biol.), research fellow at the Laboratory of Cell Differentiation Mechanisms, Institute of Cytology and Genetics SB RAS (Novosibirsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5790-3548>

E-mail: msharakh@vt.edu

The Authors declare no conflict of interest.

*Статья поступила в редакцию 26.08.2024;
одобрена после рецензирования 20.11.2024; принята к публикации 03.03.2025.*

*The article was submitted 26.08.2024;
approved after reviewing 20.11.2024; accepted for publication 03.03.2025.*

Научная статья
УДК 576.5+576.316
doi: 10.17223/19988591/69/21

На пути к созданию надёжных линий наивных плюрипотентных клеток человека

Александр Игоревич Шевченко¹, Амин МХД Арссан²,
Ирина Сергеевна Захарова³

^{1, 2, 3} *Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, Россия*

¹ <https://orcid.org/0000-0001-6535-1627>, epigene@bionet.nsc.ru

² <https://orcid.org/0009-0001-2087-4202>, arsanmhdamin@yandex.ru

³ <https://orcid.org/0000-0003-3643-5818>, zakharova@bionet.nsc.ru

Аннотация. Линии наивных плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) человека – новый инструмент клеточной биологии, демонстрирующий огромный потенциал для научных исследований и практического применения, однако их массовому использованию препятствуют проблемы с длительным культивированием и неспособностью запускать процесс случайной инактивации X-хромосомы (гХС). В данной работе мы исследовали возможность запускать гХС в среде HENSM, предложенной ранее для получения и длительного поддержания наивных ПСК. Мы показали, что наивные ПСК можно культивировать в среде HENSM, содержащей только ингибиторы сигнальных путей дифференцировки без ростовых факторов LIF и ACTIVIN A, что способствует повышению в культуре доли клеток, экспрессирующих транскрипционный фактор LEUTX, характерный для 8С-подобных тотипотентных клеток человека, а также приводит к увеличению доли клеток, способных запускать гХС. Полученные результаты свидетельствуют, что возможность контролировать полную реактивацию, а также ранние стадии гХС у человека в культурах клеток, соответствующих преимплантационным стадиям развития эмбриона, лежит за пределами наивного плюрипотентного состояния и связана с переходом к тотипотентному состоянию.

Ключевые слова: наивные плюрипотентные стволовые клетки человека, инактивация X-хромосомы, клеточные модели заболеваний человека

Источник финансирования: работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № 24-15-00346.

Благодарности: микроскопические исследования и проточная цитометрия проводились в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН (<https://ckp.icgen.ru/ckpmabo/>), финансируемом в рамках бюджетного проекта FWNR-2022-0015. Секвенирование выполняли в ЦКП «Геномика» СО РАН.

Для цитирования: Шевченко А.И., Арссан А.М., Захарова И.С. На пути к созданию надёжных линий наивных плюрипотентных клеток человека // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2025. № 69. С. 184–193. doi: 10.17223/19988591/69/21

Towards the generation of safe naïve human pluripotent cell lines

Alexander I. Shevchenko¹, Amin Mhd Arssan², Irina S. Zakharova³

^{1, 2, 3} *Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation*

¹ <https://orcid.org/0000-0001-6535-1627>, epigene@bionet.nsc.ru

² <https://orcid.org/0009-0001-2087-4202>, arsanmhdamin@yandex.ru

³ <https://orcid.org/0000-0003-3643-5818>, zakharova@bionet.nsc.ru

Summary. Naïve pluripotent stem cells (PSCs) have become an invaluable tool for biomedical research over the last decade. They correspond to pre-implantation epiblast blastomeres and have a broad differentiation potential into embryonic and extra-embryonic derivatives. Under certain conditions, naïve PSCs can initiate X-chromosome inactivation during differentiation, but this occurs in a non-random manner, with a preference for the X-chromosome, which was already inactive prior to the PSC conversion to the naïve state. As a result, the enormous potential of naïve PSCs is not fully exploited, prompting the need to improve the conditions for the derivation and maintenance of naïve PSCs. In this study, we evaluated the ability to induce random X chromosome inactivation (rXCI) by naïve embryonic stem cells (ESCs) cultured in three modifications of HENSM medium. We returned primed HuES9 ESCs to the naïve state in three media: HENSM-LA (supplemented with the growth factors LIF and Activin A), HENSM-L (supplemented with LIF only) and basal HENSM-0 without factors. The resulting cultures demonstrated a morphology and other characteristics of naïve pluripotency (See Fig. 1a-e), including increased expression of naïve pluripotency-associated transcription factors such as *TFCP2L1*, *KLF17* and *DMNT3L* (See Fig. 1, f). Naïve HUES9 cultures grown in HENSM medium without Activin A and/or LIF show significantly higher expression of the totipotency genes *LUETX*, *TPRX1* and *ZSCAN4* ($p < 0.01$) (See Fig. 1, f) and an increase in the proportion of cells with the *LEUTX* transcription factor, characteristic of 8C-like human totipotent cells (See Fig. 2, a). Thus, the absence of growth factors in HENSM medium results in naïve cells approaching the totipotent state. We also found that naïve human PSCs maintained in HENSM medium without growth factors have a greater potential to induce rXCI during differentiation (See Fig. 2). The likelihood of rXCI triggering in naïve HuES9 ESCs in HENSM medium increases with the proportion of cells expressing totipotency markers. This suggests that the capacity for rXCI in humans is restored close to the totipotent state. These results will help to improve the conditions for the generation and maintenance of naïve human PSC, allowing their unique properties to be more widely exploited in biomedical research.

The article contains 2 Figures, 5 References.

Keywords: naïve human pluripotent stem cells, X-chromosome inactivation, cell models of human diseases

Fundings: This work was supported by the Russian Science Foundation, project № 24-15-00346.

Acknowledgments: Microscopy and flow cytometry studies were performed at the Centre for Microscopic Analysis of Biological Objects, ICiG SB RAS (<https://ckp.icgen.ru/ckpmabo/>), funded under the state project FWN-2022-0015. Sequencing was carried out at the Genomics Centre of the SB RAS.

For citation: Shevchenko AI, Arssan AM, Zakharova IS. Towards the generation of safe naïve human pluripotent cell lines. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya* = *Tomsk State University Journal of Biology*. 2025;69:184-193. doi: 10.17223/19988591/69/21

Введение

Поддерживаемые в культуре наивные плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) человека – эквивалент преимплантационных blastомеров эпибласта ранней blastоцисты – представляют собой многообещающий инструмент для научных исследований процессов раннего развития, моделирования генетически детерминированных заболеваний, разработки лекарственных препаратов, прогресса репродуктивных технологий и регенеративной медицины [1–3]. Отмечают, что в культурах наивных ПСК с низкой частотой присутствуют клетки в тотипотентном состоянии, которые морфологически неотличимы от наивных ПСК [4]. Наивные ПСК получают из линий клеток с праймированной плюрипотентностью, отражающих более поздние этапы развития постимплантационного эмбриона на стадии начала гаструляции и имеющих существенные ограничения в потенциале дифференцировки, однако стабильно поддерживающихся в культуре на протяжении неограниченного числа пассажей. Несмотря на обилие протоколов, позволяющих получать наивные ПСК человека, длительное поддержание *in vitro* клеток в состоянии наивной плюрипотентности проблематично. Используемые компоненты «наивных» сред вызывают в культурах хромосомные aberrации и необратимое деметилирование импринтированных локусов генома. Кроме того, условия культивирования наивных ПСК не способствуют полной реактивации неактивной X-хромосомы и не позволяют запускать процесс случайной инактивации X-хромосомы, являющийся важным для нормального эмбрионального и постнатального развития. В 2021 г. для культивирования наивных ПСК человека предложена среда HENSM, которая включает ингибитор сигнального пути WNT и не содержит его активаторов, что способствует поддержанию кариотипической стабильности культур [3]. Также в среде HENSM снижена концентрация компонентов, вызывающих необратимое деметилирование ДНК. Однако потенциал данной среды к регуляции процесса случайной инактивации не выяснен. Цель работы – исследование возможности регулировать процесс инактивации X-хромосомы в наивных ПСК человека с использованием среды HENSM.

Материалы и методы

В работе использовали линию эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека NuES9 (номер hPSCreg: HVRDe009-A (RRID:CVCL_0057)) с кариотипом 46, XX. Праймированные ЭСК культивировали на слое митотически инактивированных эмбриональных фибробластов мыши в среде KnockOut DMEM, содержащей 15% заменителя сыворотки KnockOut SR, 1% раствора заменимых аминокислот NEAA, 0,25 мМ 2-меркаптоэтанола, 1 мМ глутамина GlutaMax (все – Thermo Fisher Scientific), 200 мкг/мл примоцина

(InvivoGen) и 10 нг/мл bFGF (Sci-store). Индукцию и поддержание наивного состояния в клетках HuES9 осуществляли в среде HENSM-0 [3], представляющей собой смесь сред Neurobasal и DMEM-F12 в соотношении 1:1; добавки: 1% N2, 1 мМ GlutaMAX, 1% NEAA (все – Thermo Fisher Scientific), 200 мкг/мл примостина (InvivoGen), 2% B27 (Invitrogen), 0,8 мМ dimethyl 2-oxoglutarate (Merk), 0,2% Geltrex (Invitrogen), 50 мг/мл L-ascorbic acid 2-phosphate (Merk), а также ингибиторы киназ: 1 мкМ PD0325901; 2 мкМ XAV939; 2 мкМ Gö6983, 1,2 мМ CGP77675 (все – R&D). Кроме того, использовали среды HENSM-L, отличающиеся от HENSM-0 наличием 20 нг/мл рекомбинантного LIF (Sci-store), а также HENSM-LA, в которую кроме LIF добавляли 10 нг/мл ACTIVIN A (Peprotech). Дифференцировку наивных ЭСК в производные трёх примитивных зародышевых листков, клетки трофобласта, а также получение трёхмерных клеточных бластоидов проводили по ранее опубликованным протоколам [3, 5]. Клетки культивировали при 37°C в атмосфере, содержащей 5% углекислого газа. Наличие специфических поверхностных антигенов и транскрипционных факторов в наивных ЭСК, а также маркеров дифференцировки у их производных демонстрировали с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания антителами по стандартным протоколам [3, 5]. Получение и анализ изображений проводили с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа «Nikon Ti-E» (Япония) и программы «NIS Elements AR».

Из праймированных и наивных клеток HuES9 выделяли РНК и на её основе синтезировали кДНК. Относительные уровни экспрессии генов *OCT4*, *NANOG*, *KLF17*, *TFCP2L1*, *DNMT3b*, *LEUTX*, *TPRX1* и *ZSCAN4* определяли с помощью полуколичественного ПЦР в режиме реального времени, используя метод $\Delta\Delta C_t$ с нормализацией на уровень генов домашнего хозяйства *ACTB*, *TFRC* и *B2M*. Эксперимент проводили в трёх биологических и двух технических повторностях. Последовательности праймеров и методические детали опубликованы ранее [3–5].

Долю клеток в культуре наивных ЭСК, экспрессирующих транскрипционный фактор LEUTX, характерный для 8С-подобных тотипотентных клеток человека, определяли на приборе «FACS Aria III» (BD, USA), анализируя 10^4 событий после преципитации клеток с соответствующими антителами (Thermo Fisher Scientific). В качестве негативного контроля использовали неокрашенные клетки и клетки, инкубированные с флуоресцентно мечеными IgG кролика. Эксперимент повторяли троекратно.

Характеристику активного и неактивного состояния X-хромосомы проводили методом иммунофлуоресцентного окрашивания антителами к модификации H3K27me3 (Abcam), характерной для хроматина тельца Барра, а также при помощи РНК FISH с зондом X-сцепленного гена *HUWE1* (BAC-клон RP11-975N19). При получении ампликонов X-сцепленных генов использовали следующие пары праймеров: (5'-ctcactgcgagtgtgaccaga-3'; 5'-gcttgaacacagtgcttgccaaagctg-3') для *IGSF1*, (5'-tcctgtcaaaatctgctccatca-3'; 5'-agctcccaaagtagatgctactg-3') для *INTS6L* и (5'-gcactgatgatcgccaactc-3'; 5' сааcатаgаgаccаccссgт-3') для *CD99*. Аллельное соотношение транскриптов

генов *IGSF1*, *INTS6L* и *CD99* X-хромосомы определяли методом пиросеквенирования ампликонов, содержащих однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), на приборе «PyromarkQ24» (QIAGEN, Германия) с использованием наборов фирмы «Интерлабсервис» (Россия). Интегральную характеристику, определяющую отклонения от случайной инактивации, рассчитывали как среднее арифметическое долей аллельной экспрессии трёх X-сцепленных генов.

Статистическую обработку результатов проводили в программах R и Excel. Достоверность отличий оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни с поправкой Бонферрони для множественного сравнения.

Результаты исследования и обсуждение

Среда HENSM изначально предложена в двух вариантах: HENSM-LA с добавлением двух ростовых факторов LIF и ACTIVIN A, а также HENSM-L с добавлением только LIF [3]. Отмечалось, что в среде HENSM-LA клетки имеют более высокий уровень экспрессии ключевых транскрипционных факторов плюрипотентности *OCT4* и *NANOG*. Однако также известно, что усиление сигнального пути фактора роста LIF способствует инициации случайной инактивации X-хромосомы [1, 2]. Кроме того, многочисленные исследования, выполненные на разных протоколах культивирования наивных ПСК человека, свидетельствуют, что отказ от ростовых факторов не ведёт к дифференцировке клеток и основную нагрузку по поддержанию наивного плюрипотентного состояния несут используемые в средах ингибиторы сигнальных путей дифференцировки [2]. В связи с этим наблюдается тенденция к снижению концентрации ростовых факторов в «наивных» средах. Так, концентрация LIF может быть уменьшена в двадцать раз. Учитывая эти сведения, мы провели получение наивных ЭСК линии NuES9 в средах HENSM-LA и HENSM-L, а также в среде HENSM-0, не содержащей ростовых факторов, и сравнили способность наивных плюрипотентных клеток, поддерживаемых в разных условиях, инициировать случайную инактивацию X-хромосомы.

Культивируемые в трёх вариантах среды HENSM ЭСК линии NuES9 имеют куполообразную форму колоний (рис. 1, *a*), демонстрируют наличие поверхностного антигена CD75, а также транскрипционных факторов TFE3 и KLF17 (рис. 1, *b*). После перевода на среды HENSM культуры NuES9 сохраняют способность давать производные трех зародышевых листков (экто-, мезо- и энтодермы) при спонтанной дифференцировке (рис. 1, *c*), а при направленной дифференцировке образуют клетки трофобласта, позитивные по поверхностным антигенам TACSTD2 и ENPEP (рис. 1, *d*). При совместном культивировании в низкоадгезивных условиях ЭСК, полученных на средах HENSM, и их трофобластных производных два типа клеток самоорганизуются, формируя трёхмерные структуры – бластоиды, напоминающие ранние эмбрионы на стадии бластоцисты (рис. 1, *e*). Таким образом, клетки NuES9, переведённые на среды HENSM, демонстрируют ключевые свойства, характерные для культур наивных ПСК.

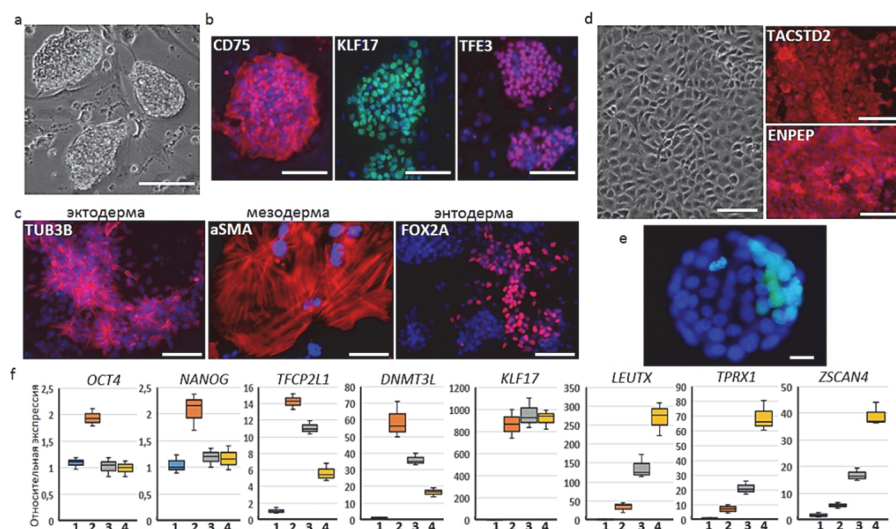


Рис. 1. Наивные ЭСК человека линии HuES9, полученные в средах HENSM: *a* – морфология колоний наивных ЭСК, *b* – иммунофлуоресцентная детекция специфических для наивного состояния ЭСК поверхностного антигена CD75 (красный), а также транскрипционных факторов TFE3 (зеленый) и KLF17 (красный), *c* – иммунофлуоресцентная детекция маркеров эктодермы (TUB3B, красный), мезодермы (αSMA, красный), энтодермы (FOX2A, красный) после спонтанной дифференцировки наивных ЭСК в производные трёх зародышевых листков, ядра окрашены DAPI (синий), линейка – 100 мкм, *d* – морфология клеток ранней трофэктодермы, производных наивных ЭСК, и их иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к поверхностным маркерам TACSTD2 (красный) и ENPEP (красный), ядра окрашены DAPI (синий), линейка – 100 мкм, *e* – репрезентативное изображение бластоида, полученного путем самоагрегации наивных ЭСК (окрашены зелёным с помощью антител к OCT4) и их трофэктодермальных производных (синий, ядра окрашены DAPI), линейка 10 мкм, *f* – относительный уровень экспрессии мРНК генов (ось Y) общей плюрипотентности (*OCT4*, *NANOG*), наивной плюрипотентности (*TFCE2L1*, *DNMT3L*, *KLF17*) и тотипотентности (*LEUTX*, *TPRX1*, *ZSCAN4*) в культурах праймированных ЭСК (1) и наивных ЭСК, поддерживаемых в средах HENSM-LA (2), HENSM-L (3) и HENSM-0 (4)

[Fig. 1. Naïve human ESCs of HuES9 line expanded in HENSM media: *a* - morphology of naïve ESC colonies, *b* - immunofluorescence detection of naïve-specific ESC surface antigen CD75 (red) as well as transcription factors TFE3 (green) and KLF17 (red), *c* - immunofluorescence detection of ectoderm (TUB3B, red), mesoderm (αSMA, red), endoderm (FOX2A, red) after spontaneous differentiation of naïve ESCs into derivatives of three germ layers, nuclei are stained with DAPI (blue), scale bar is 100 μm, *d* - morphology of early trophoblast cells derived from naïve ESCs, and their immunofluorescence staining with antibodies to surface markers TACSTD2 (red) and ENPEP (red), nuclei are stained with DAPI (blue), scale bar is 100 μm, *e* - representative image of blastoid obtained by self-aggregation of naïve ESCs (stained green, using antibodies to OCT4) and their trophoblast derivatives (blue, nuclei are stained with DAPI), scale bar is 100 μm, *f* - relative mRNA expression level of genes (Y-axis) of general pluripotency (*OCT4*, *NANOG*), naïve pluripotency (*TFCE2L1*, *DNMT3L*, *KLF17*) and totipotency (*LEUTX*, *TPRX1*, *ZSCAN4*) in cultures of primed ESCs (1) and naïve ESCs maintained in HENSM-LA (2), HENSM-L (3) and HENSM-0 (4) media]

Основные эндогенные факторы транскрипции плюрипотентности *OCT4* и *NANOG* по результатам ПЦР в режиме реального времени демонстрируют высокие уровни экспрессии в наивных ЭСК, при этом в культурах HENSM-L и HENSM-0 они сопоставимы с таковыми в праймированных ЭСК, а в клетках

HENSM-LA имеют статистически более высокий уровень ($p < 0,01$) (рис. 1, *f*). В наивных ЭСК по сравнению с праймированными обнаруживается статистически более высокий уровень мРНК генов *TFCP2L1*, *DNMT3L* и *KLF17* ($p < 0,01$). Однако относительная экспрессия *TFCP2L1* и *DNMT3L* значимо ниже ($p < 0,01$) в клетках HENSM-L и HENSM-0 по сравнению с таковой в клетках HENSM-LA. В то же время клетки HENSM-L и HENSM-0 по сравнению с праймированными ЭСК и клетками HENSM-LA имеют повышенный уровень мРНК генов *LEUTX*, *TPRX1* и *ZSCAN4* ($p < 0,01$), высокая экспрессия которых характерна для 8С-подобных тотипотентных клеток человека. Таким образом, можно предположить, что в культурах клеток HENSM-L и HENSM-0 увеличивается доля клеток, экспрессирующих гены, свойственные тотипотентному состоянию.

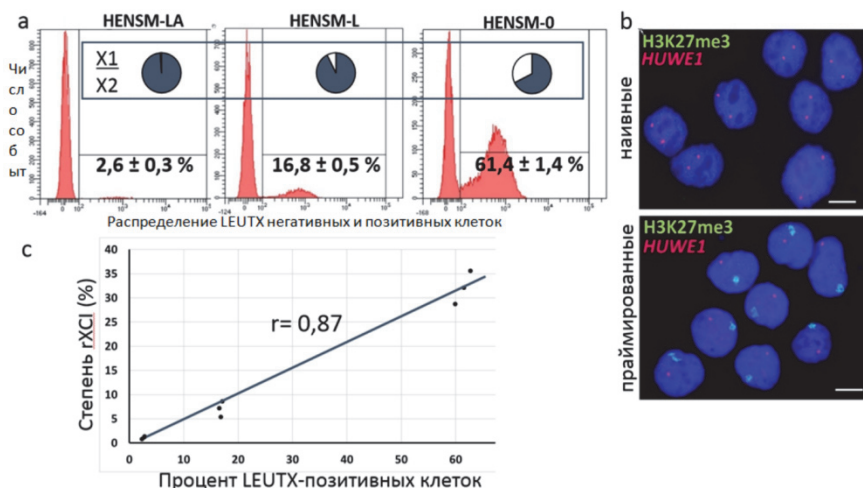


Рис. 2. Корреляция между долей клеток с маркером тотипотентности LEUTX в культуре наивных ЭСК и их способностью воспроизводить случайную инактивацию X-хромосомы: *a* – количественная оценка доли клеток с маркером LEUTX, культивируемых в средах HENSM-LA, HENSM-L и HENSM-0 (на графиках проточной цитометрии приведена средняя величина со стандартным отклонением), круговые диаграммы показывают соотношение экспрессии аллелей (X1/X2) генов X-хромосомы после запуска инактивации, *b* – эпигенетический статус X-хромосом в культурах наивных и повторно праймированных ЭСК, репрезентативные изображения иммунофлуоресцентного окрашивания ядер ЭСК с антителами к модификации H3K27me3 (зеленый) и РНК FISH с зондом X-сцепленного гена *HUWE1* (красный); ядра окрашены DAPI (синий), линейка – 10 мкм, *c* – график зависимости степени случайной инактивации (ось Y) от доли клеток с маркером тотипотентности LEUTX (ось X), величина, определяющая степень случайной инактивации (rXCI), рассчитана как среднее арифметическое долей аллельной экспрессии трёх X-сцепленных генов [Fig. 2. Correlation between the proportion of cells with LEUTX totipotency marker in naïve ESCs culture and their ability to reproduce random X chromosome inactivation: *a* - quantification of the proportion of cells with LEUTX marker, cultured in HENSM-LA, HENSM-L and HENSM-0 media (mean value with standard deviation are indicated on the flow cytometry plots), the pie charts show the allele expression ratio (X1/X2) of X chromosome genes after inactivation onset, *b* - epigenetic status of X chromosomes in cultures of naïve (top image) and re-primed ESCs (bottom image), representative immunofluorescence images of ESC nuclei stained with antibodies to H3K27me3 (green) and RNA FISH with the probe to the X-linked gene *HUWE1* (red); nuclei are stained with DAPI (blue), scale bar is 10 μ m, *d* - correlation plot between the degree of random inactivation (Y-axis) and the proportion of cells with LEUTX totipotency marker X-axis, the value determining the degree of random inactivation was calculated as the mean of the allelic expression from 3 X-linked genes]

Анализ культур клеток методом проточной цитометрии показал, что доля клеток с маркером LEUTX, свойственным 8С-подобным тотипотентным клеткам человека, статистически значимо повышается в культурах наивных ПСК HENSM-L и HENSM-0, в которых отсутствуют ростовые факторы ACNIVIN A и/или LIF (см. рис. 2, *a*). Максимальная доля LEUTX-позитивных клеток при этом выявлена в среде HENSM-0, не содержащей ростовых факторов.

Далее мы показали, что в культурах наивных ЭСК HENSM-LA, HENSM-L и HENSM-0 наблюдается биаллельная экспрессия гена *HUWE1* (два сигнала в ядре) и отсутствие аккумуляции H3K27me3 на X-хромосоме, что свидетельствует о том, что обе X-хромосомы в ядрах активны (рис. 2, *b*). После возврата наивных ЭСК в праймированное состояние в клетках наблюдается моноаллельная экспрессия гена *HUWE1* (один сигнал в ядре) и детектируется область ядра, в которой происходит аккумуляция модификации H3K27me3, характерной для хромосомной территории, инактивированной X-хромосомы. Наивные ЭСК HuES9 в культурах HENSM-LA, HENSM-L и HENSM-0 имеют две активные X-хромосомы в 97–99% клеток ($N = 300$), а при возвращении наивных ЭСК в праймированное состояние в 94–97% клеток ($N = 300$) наблюдается инактивация X-хромосомы (рис. 2, *b*). Получена кДНК повторно праймированных клеток HENSM-LA, HENSM-L и HENSM-0, демонстрирующих инактивацию, и синтезированы ампликоны трёх генов в участках, содержащих SNP. Определение нуклеотидной последовательности ампликонов с помощью пиросеквенирования позволило установить долю каждого аллеля X-хромосом после инактивации. Праймированные производные клеток HENSM-LA показывают экспрессию преимущественно одного аллеля, что свидетельствует о практически полной случайной инактивации. В праймированных производных культур HENSM-L и HENSM-0 доля второго аллеля увеличивается, коррелируя с увеличением доли клеток с маркером тотипотентности LEUTX (рис. 2, *a, c*).

Таким образом, возврат праймированных ПСК в состояние, эквивалентное преимплантационным blastomeres, возможен в средах, содержащих исключительно ингибиторы киназ сигнальных путей дифференцировки без использования ростовых факторов. Можно предположить, что наличие ростовых факторов в среде HENSM усиливает плюрипотентность, тогда как отказ от ростовых факторов возвращает клетки на более ранние стадии эмбрионального развития, близкие к тотипотентному состоянию. Другой важный вывод этого исследования заключается в том, что клетки человека в состоянии наивной плюрипотентности, по-видимому, не способны запускать процесс случайной инактивации, и выбор X-хромосомы для инактивации на данной стадии уже предопределён. Отмена ростовых факторов в среде HENSM вызывает увеличение доли клеток, близких к тотипотентному состоянию, у которых появляется возможность выбора будущей неактивной X-хромосомы и запуска случайной инактивации. Результаты работы можно использовать для дальнейшей оптимизации протоколов получения и поддержания культур клеток, имитирующих преимплантационное развитие зародыша, обладающих кариотипической и эпигенетической стабильностью

и способных в полной мере воспроизводить ключевые процессы раннего эмбрионального развития.

Заключение

В результате работы показано, что способность культуры наивных плюрипотентных клеток человека воспроизводить процесс случайной инактивации X-хромосомы напрямую зависит от доли клеток в культуре, демонстрирующих переход к тотипотентному состоянию. Этот результат свидетельствует, что возможность исследовать и контролировать полную реактивацию, а также ранние стадии процесса инактивации X-хромосомы у человека в культурах клеток, соответствующих преимплантационным стадиям развития эмбриона, лежит за пределами наивного плюрипотентного состояния клеток и связана с их переходом к тотипотентному состоянию. В дальнейшем необходимо подтвердить полученные выводы, используя большее число линий ПСК.

Список источников

1. Collier A.J., Rugg-Gunn P.J. Identifying Human Naïve Pluripotent Stem Cells - Evaluating State-Specific Reporter Lines and Cell-Surface Markers // *BioEssays*. 2018. Vol. 40, № 5. 1700239. doi: 10.1002/BIES.201700239
2. Zhou J., Hu J., Wang Y., Gao S. Induction and application of human naive pluripotency. *Cell Reports*. 2023. Vol. 42, № 4. 112379. doi: 10.1016/J.CELREP.2023.112379
3. Bayerl J., Ayyash M., Shani T., Manor Y.S., Gafni O., Massarwa R., Kalma Y., Aguilera-Castrejon A., Zerbib M., Amir H., Sheban D., Geula S., Mor N., Weinberger L., Naveh Tassa S., Krupalnik V., Oldak B., Livnat N., Tarazi S., Tawil S., Wildschutz E., Ashoukhi S., Lasman L., Rotter V., Hanna S., Ben-Yosef D., Novershtern N., Viukov S., Hanna J.H. Principles of signaling pathway modulation for enhancing human naive pluripotency induction // *Cell Stem Cell*. 2021. Vol. 28, № 9. PP. 1549–1565.e12. doi: 10.1016/J.STEM.2021.04.001
4. Yu X., Liang S., Chen M., Yu H., Li R., Qu Y., Kong X., Guo R., Zheng R., Izsvák Z., Sun C., Yang M., Wang J. Recapitulating early human development with 8C-like cells // *Cell Reports*. 2022. Vol. 39, № 12. 110994. doi: 10.1016/j.celrep.2022.110994
5. Shevchenko A.I., Arssan A.M., Zakian S.M., Zakharova I.S. Chemokine CCL2 Activates Hypoxia Response Factors Regulating Pluripotency and Directed Endothelial Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells // *Russian Journal of Developmental Biology*. 2023. Vol. 54, № 2. PP. 134–146. doi: 10.1134/s1062360423020054

References

1. Collier AJ, Rugg-Gunn PJ. Identifying Human Naïve Pluripotent Stem Cells - Evaluating State-Specific Reporter Lines and Cell-Surface Markers. *BioEssays*. 2018;40(5):1700239. doi: 10.1002/BIES.201700239
2. Zhou J, Hu J, Wang Y, Gao S. Induction and application of human naive pluripotency. *Cell Reports*. 2023;42(4):112379. doi: 10.1016/J.CELREP.2023.112379
3. Bayerl J, Ayyash M, Shani T, Manor YS, Gafni O, Massarwa R, Kalma Y, Aguilera-Castrejon A, Zerbib M, Amir H, Sheban D, Geula S, Mor N, Weinberger L, Naveh Tassa S, Krupalnik V, Oldak B, Livnat N, Tarazi S, Tawil S, Wildschutz E, Ashoukhi S, Lasman L, Rotter V, Hanna S, Ben-Yosef D, Novershtern N, Viukov S, Hanna JH. Principles of signaling pathway modulation for enhancing human naive pluripotency induction. *Cell Stem Cell*. 2021;28(9):1549-1565.e12. doi: 10.1016/J.STEM.2021.04.001

4. Yu X, Liang S, Chen M, Yu H, Li R, Qu Y, Kong X, Guo R, Zheng R, Izsvák Z, Sun C, Yang M, Wang J. Recapitulating early human development with 8C-like cells. *Cell Reports*. 2022;39(12):110994. doi: 10.1016/j.celrep.2022.110994
5. Shevchenko AI, Arssan AM, Zakian SM, Zakharova IS. Chemokine CCL2 Activates Hypoxia Response Factors Regulating Pluripotency and Directed Endothelial Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells. *Russian Journal of Developmental Biology*. 2023;54(2):134-146. doi: 10.1134/s1062360423020054

Информация об авторах:

Шевченко Александр Игоревич, канд. биол. наук, с.н.с. лаборатории клеточных 3D-моделей атеросклероза ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6535-1627>

E-mail: epigene@bionet.nsc.ru

Арссан МХД Амин, м.н.с. межинститутской лаборатории молекулярной палеогенетики и палеогеномики ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-2087-4202>

E-mail: arsanmhdamin@yandex.ru

Захарова Ирина Сергеевна, канд. биол. наук, зав. лабораторией клеточных 3D-моделей атеросклероза ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3643-5818>

E-mail: zakharova@bionet.nsc.ru

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Information about the authors:

Alexander I. Shevchenko, PhD (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of 3D Cellular Models of Atherosclerosis, Institute of Cytology and Genetics SB RAS (Novosibirsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6535-1627>

E-mail: epigene@bionet.nsc.ru

Amin Mhd Arssan, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Palaeogenetics and Palaeogenomics, Institute of Cytology and Genetics SB RAS (Novosibirsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-2087-4202>

E-mail: arsanmhdamin@yandex.ru

Irina S. Zakharova, PhD (Biol.), Head of the Laboratory of 3D Cellular Models of Atherosclerosis, Institute of Cytology and Genetics SB RAS (Novosibirsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3643-5818>

E-mail: zakharova@bionet.nsc.ru

The Authors declare no conflict of interest.

*Статья поступила в редакцию 29.08.2024;
одобрена после рецензирования 20.11.2024; принята к публикации 03.03.2025.*

*The article was submitted 29.08.2024;
approved after reviewing 20.11.2024; accepted for publication 03.03.2025.*