

ISSN 0016-6758

Том 59, Номер 4

Апрель 2023



ГЕНЕТИКА



www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 59, номер 4, 2023

Обзорные и теоретические статьи

Литературный обзор *NBAS*-ассоциированных патологий. Все ли найдены?

Л. Р. Жожиков, Ф. Ф. Васильев, Н. Р. Максимова 371

Регуляторный потенциал ко-локализованных с генами кардиомиопатий некодирующих РНК

А. Н. Кучер, М. С. Назаренко 381

Генетика микроорганизмов

Генетически изолированная популяция дрожжей *Saccharomyces bayanus* в Новой Зеландии и Австралии

А. Н. Боровкова, Г. И. Наумов, А. В. Шнырева, Е. С. Наумова 403

Генетика растений

Новый аллель 5'-UTR *LcyE* коррелирует с повышенной экспрессией гена ликопин- ϵ -циклазы, определяющей поток ветви β - ϵ пути биосинтеза каротиноидов у кукурузы

Д. Х. Архестова, Г. И. Ефремов, С. П. Аппаев, Е. З. Кочиева, А. В. Щенникова 417

Генетика животных

Генетическая дифференциация и родственные связи *Cottus kolymentis* Sideleva et Goto, 2012 (Cottidae)

О. А. Радченко, И. Н. Морева, А. В. Петровская 425

Мониторинг генетической структуры популяции соболя (*Martes zibellina* Linnaeus, 1758) Среднего Приамурья

Л. В. Фрисман, А. Л. Брыкова 437

Генетическая интрогрессия в популяциях двух близких видов *Adalia frigida* (Schneider, 1792) и *Adalia bipunctata* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Coccinellidae) в зоне симпатрии

Д. А. Романов, Е. В. Шайкевич, И. А. Захаров 448

Информативность 11 микросателлитных локусов для экспертной ДНК-идентификации диких и фермерских норок американских (*Mustela vison*) в Беларуси

О. Н. Лукашкова, Е. А. Спивак, С. А. Котова 460

Генетика человека

Полиморфизм локуса rs1815739 гена *ACTN3* и влияющего на его экспрессию *cis*-eQTL rs11227639 в популяциях Сибири

Б. А. Малярчук, М. В. Деренко, Г. А. Денисова 474

Краткие сообщения

Ассоциация полиморфизма VNTR гена *AS3MT* с риском развития шизофрении

Г. И. Коровайцева, Т. В. Лежейко, И. В. Олейчик, В. Е. Голимбет

481

Хроника

Научная конференция с международным участием “Генетические процессы в популяциях”
(Москва, 11–14 октября 2022 г.)

Д. В. Политов, Е. А. Мудрик

487

Contents

Vol. 59, No. 4, 2023

Reviews and Theoretical Articles

The Function of the *NBAS* Has Been Revealed, Will the Same Happen with Its Multisystem Pathologies?

L. R. Zhozhikov, F. F. Vasilev, and N. R. Maksimova

371

Regulatory Potential of Non-Coding RNAs Colocalized with Cardiomyopathy-Related Genes

A. N. Kucher and M. S. Nazarenko

381

Genetics of Microorganisms

Genetically Isolated Population of *Saccharomyces bayanus* in New Zealand and Australia

A. N. Borovkova, G. I. Naumov, A. V. Shnyreva, and E. S. Naumova

403

Plant Genetics

New 5'-UTR *LcyE* allele Correlates with Increased Expression of the Lycopine- ϵ -Cyclase Gene Determining the Flow of the β - ϵ Branch of the Carotenoid Biosynthesis Pathway in Maize

*D. H. Arkhestova, G. I. Efremov, S. P. Appaev,
E. Z. Kochieva, and A. V. Shchennikova*

417

Animal Genetics

Genetic Differentiation and Relationships *Cottus kolymensis* Sideleva et Goto, 2012 (Cottidae)

O. A. Radchenko, I. N. Moreva, and A. V. Petrovskaya

425

Monitoring the Genetic Structure of the Sable Population (*Martes zibellina* Linnaeus, 1758) Middle Amur Region

L. V. Frisman and A. L. Brykova

437

Genetic Introgression in Populations of Two Related Species *Adalia frigida* (Schneider, 1792) and *Adalia bipunctata* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Coccinellidae) in the Zone of Sympatry

D. A. Romanov, E. V. Shaikevich, and I. A. Zakharov

448

Informative Relevance of 11 Microsatellite Loci for Forensic DNA-Identification of Wild and Farm American Mink (*Mustela vison*) in Belarus

V. M. Lukashkova, A. A. Spivak, and S. A. Kotova

460

Human Genetics

Polymorphism of the rs1815739 Locus of the *ACTN3* Gene and rs11227639 *cis*-eQTL Affecting Its Expression in Populations of Siberia

B. A. Malyarchuk, M. V. Derenko, and G. A. Denisova

474

Short Communications

Association of VNTR Polymorphism of the *AS3MT* Gene with the Risk of Schizophrenia

G. I. Korovaitseva, T. V. Lezheiko, I. V. Oleichik, and V. E. Golimbet

481

Chronicle

Scientific Conference with International Participation “Genetic Processes in Populations”
(Moscow, October 11–14, 2022)

D. V. Politov, E. A. Mudrik

487

ОБЗОРНЫЕ
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 575.164

ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР *NBAS*-АССОЦИИРОВАННЫХ ПАТОЛОГИЙ. ВСЕ ЛИ НАЙДЕНЫ?

© 2023 г. Л. Р. Жожиков¹, *, Ф. Ф. Васильев¹, Н. Р. Максимова¹

¹Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, Медицинский институт, Якутск, 677013 Россия

*e-mail: leonid.zhzhikov@gmail.com

Поступила в редакцию 03.06.2022 г.

После доработки 31.08.2022 г.

Принята к публикации 02.09.2022 г.

Мутации в гене *NBAS* вызывают две группы заболеваний — SOPH-синдром и синдром детской печеночной недостаточности 2-го типа (ILFS2, RALF), отличающиеся клиническими проявлениями, течением и прогнозами. Проведен литературный обзор клинико-генетических аспектов данных патологий и молекулярной биологии белка *NBAS*, а конкретно ретроградного мембранного трафика и нонсенс-опосредованного распада РНК.

Ключевые слова: *NBAS* (*NAG*), мембранный трафик, нонсенс-опосредованный распад РНК, SOPH-синдром, синдром детской печеночной недостаточности 2-го типа (ILFS2).

DOI: 10.31857/S0016675823040124, **EDN:** AYG TUB

SOPH-синдром (SOPH, Short stature, Optic atrophy, Pelger-Huet anomaly of leucocytes — OMIM #614800) является моногенным аутосомно-рецессивным наследственным заболеванием, характеризующимся триадой признаков: постнатальной гипоплазией, атрофией зрительных нервов и пельгеровской аномалией лейкоцитов [1]. SOPH-синдром, впервые описанный в 2010 г., считался распространенным только в якутской популяции, тем не менее каждый год по литературным данным обнаруживаются новые случаи SOPH-подобных состояний по всему миру. Частота гетерозиготного носительства причинной мутации составила 1300 на 100 000 здоровых якутов, при этом в Республиканском генетическом регистре наследственной и врожденной патологии Якутии насчитывается более 84 обнаруженных случаев SOPH по Республике Саха (Якутия), что составляет частоту чуть более 18 пациентов на 100 000 якутской популяции [2].

Детская печеночная недостаточность 2-го типа (ILFS2, Infantile Liver Failure Syndrome type 2 — OMIM #616483) — аутосомно-рецессивное заболевание, характеризующееся повторяющимися эпизодами острой печеночной недостаточности во время лихорадки, описанное впервые в 2015 г. Данный синдром встречается повсеместно и манифестирует в младенческом, раннем детском возрасте и считается одной из основных причин детской смертности неизвестной этиологии [3, 4]. Особенностью является полное выздоровление между эпизодами печеночной недостаточности, триггером ко-

торой чаще всего выступает вирусная инфекция, вызывающая лихорадку.

Причинами обеих патологий являются мутации в гене *NBAS*. Белок *NBAS* участвует в ретроградном транспорте везикул и в нонсенс-опосредованном распаде РНК (NMD, nonsense mediated RNA decay) [5, 6]. Стоит отметить, что хоть SOPH и ILFS2 описаны при мутациях в одном гене фенотипы их сильно различаются. Например, при SOPH-синдроме не наблюдается печеночной недостаточности, а при ILFS2 не наблюдается триады SOPH. Эти данные наталкивают на вопросы относительно функции белка и механизмов его реализации, а также о патофизиологии данных заболеваний. В настоящей работе освещена современная молекулярная биология белка и описаны фенотипы двух синдромов, ассоциированных с мутациями в гене *NBAS*.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ *NBAS*

Ген *NBAS* (neuroblastoma amplified sequence), также известный как *NAG* (neuroblastoma amplified gene), был впервые обнаружен в конце прошлого века в клеточных линиях нейробластом как коамплифицирующийся ген вместе с *MYCN*, он считался предиктором течения нейробластомы [7]. Амплификация фрагментов ДНК при онкологических заболеваниях считается неблагоприятным признаком течения, и обнаруженный новый ген во фрагментарном бульоне опухолевого ДНК помог пролить свет на разнообразие клинических

исходов нейробластом. Несмотря на то что коамплификация гена *NBAS* + *MYCN* была связана с более благоприятным течением заболевания у пациентов, функция гена оставалась неизвестной и никаких однозначных выводов тогда сделано не было [8–10].

Позже Т. Аоки с соавт. [5] на клеточных линиях HeLa и 273T было установлено, что белок NBAS является частью комплекса синтаксина 18 (STX18), участвующего в ретроградном транспорте везикул с аппарата Гольджи (аГ) до эндоплазматического ретикула (ЭР). Также D. Longman с соавт. на примере эмбрионального развития рыбок *D. rerio* было предложено и впоследствии доказано на клеточных линиях HeLa участие NBAS в нонсенс-опосредованном распаде РНК (NMD) [11]. Этим же коллективом авторов впоследствии была опубликована модель механизма работы и взаимодействия NBAS с другими участниками NMD [12].

Свойства и структура NBAS

Основными доменами белка можно считать два: SEC39 и β -пропеллер. Регион с β -пропеллером перекрывается тремя схожими доменами: бета-цепью хинопротеинаминодегидрогеназы, повторами WD40/YVTN и одноименным доменом N-конца Neuroblastoma-amplified sequence. По данным исследований на археях β -пропеллер защищает клетку от воздействий экстремальных факторов, а повторы WD40 являются скаффолдом для белок-белковых взаимодействий различных белковых комплексов [13]. Считается, что домен SEC39 ассоциирован с мембранным транспортом везикул от аппарата Гольджи к ЭР (рис. 1).

Эксперименты, проведенные с урезанными белками NBAS, показали отсутствие связи с белком-партнером по мембранному трафику p31 при укорочении с C-конца, а при укорочении с N-конца не наблюдалось взаимодействия с ZW10 и RINT-1 [5]. Белок NBAS не обладает тканевой специфичностью и обнаруживается во всех типах клеток. Тем не менее в исследованиях на эмбрионах мышей был обнаружен особый паттерн экспрессии NBAS, характеризующийся диффузной экспрессией на конечностях на начальных стадиях развития (11-й день) и затем постепенным смещением экспрессии больше к эктодерме и перихондриальной мезодерме (на 13-й день). Аналогичный паттерн наблюдался при окрашивании срезов всего тела: на ганглиях дорсальных корешков и в нервной трубке, а также в коронарном отделе головного мозга (на 13-й день). Также специфичное окрашивание было обнаружено на хондроцитах тел позвонков. Принимая это во внимание, можно сказать, что белок NBAS востребован на начальных этапах развития эмбрионов млекопитающих. Тем не менее эти данные, а именно участие NBAS в раннем

физиологическом развитии не объясняет некоторые клинические наблюдения, связанные с нередкой поздней манифестацией ILFS2 (примерно в 6.5 лет), предполагая, что NBAS имеет постоянную роль в жизнедеятельности клетки и не ограничивается физиологическим развитием [14].

Роль NBAS в ретроградном транспорте

Мембранный трафик хорошо изучен у таких организмов как дрожжи и бактерии [15]. Вкратце органеллы, участвующие в секреторном и эндокринном путях клетки, коммуницируют между собой при помощи транзитных везикул (внутри которых, например, незрелые белки), отпочковывающихся от донорной органеллы и транспортирующихся к акцепторной. При отпочковании везикула покрывается специальным покрытием — белками-коатомерами COPI или COPII (Coat Protein), которое она теряет при слиянии с акцепторной органеллой. Сцепка везикул с целевой органеллой осуществляется семейством малых гуанозинтрифосфатгидролаз Rab (Rab-ГТФаз) и связывающими факторами, после чего следует слияние мембран везикулы и органеллы при помощи комплекса SNARE (Soluble NSF Attachment Receptor), локализующегося на мембране акцепторной органеллы. Связывающие факторы, которые регулируют не только сцепку, но и процесс слияния везикулы, можно поделить на две группы: группа белков, содержащих вытянутые суперспирали, и мульти-субъединичные комплексы (MTC, Multisubunit Tethering Complex). Таким образом коммуницируют такие органеллы как аппарат Гольджи (аГ) и эндоплазматический ретикулум (ЭР): везикулы покрытые COPII отпочковываются от ЭР и транспортируются в аГ, где затем сливаются с его мембраной, — антероградный транспорт, а от аГ обратно в ЭР возвращаются везикулы покрытые COPI — ретроградный транспорт. Сцепка и слияние COPI с ЭР у дрожжей регулируется комплексом Dsl1. Этот комплекс, включающий Dsl1, Tip20 и Sec39/Dsl3, входит в подсемейство комплексов CATCHR (Complexes Associated with Tethering Containing Helical Rods), являющихся MTC. Механизм действия комплекса заключается в том, что Dsl1 как “лаццо” связывается с COPI, в то время как Tip20 и Dsl3 держатся за комплекс SNARE, а конкретно за его компоненты Sec20 и Use1 соответственно. Комплекс SNARE далее, являясь предполагаемым донором механохимической энергии, завершает процесс слияния везикулы с органеллой [16].

Ортологом у млекопитающих комплекса Dsl1 является комплекс NRZ: NBAS — Sec39/Dsl3, RINT1 — Tip20 и ZW10, являющийся ортологом Dsl1 соответственно. Как и комплекс Dsl1, NRZ взаимодействует со SNARE: RINT1 с BNIP1 (Sec20) и NBAS с p31 (Use1), тем самым выполняя аналогичные функции сцепки и слияния везикулы с

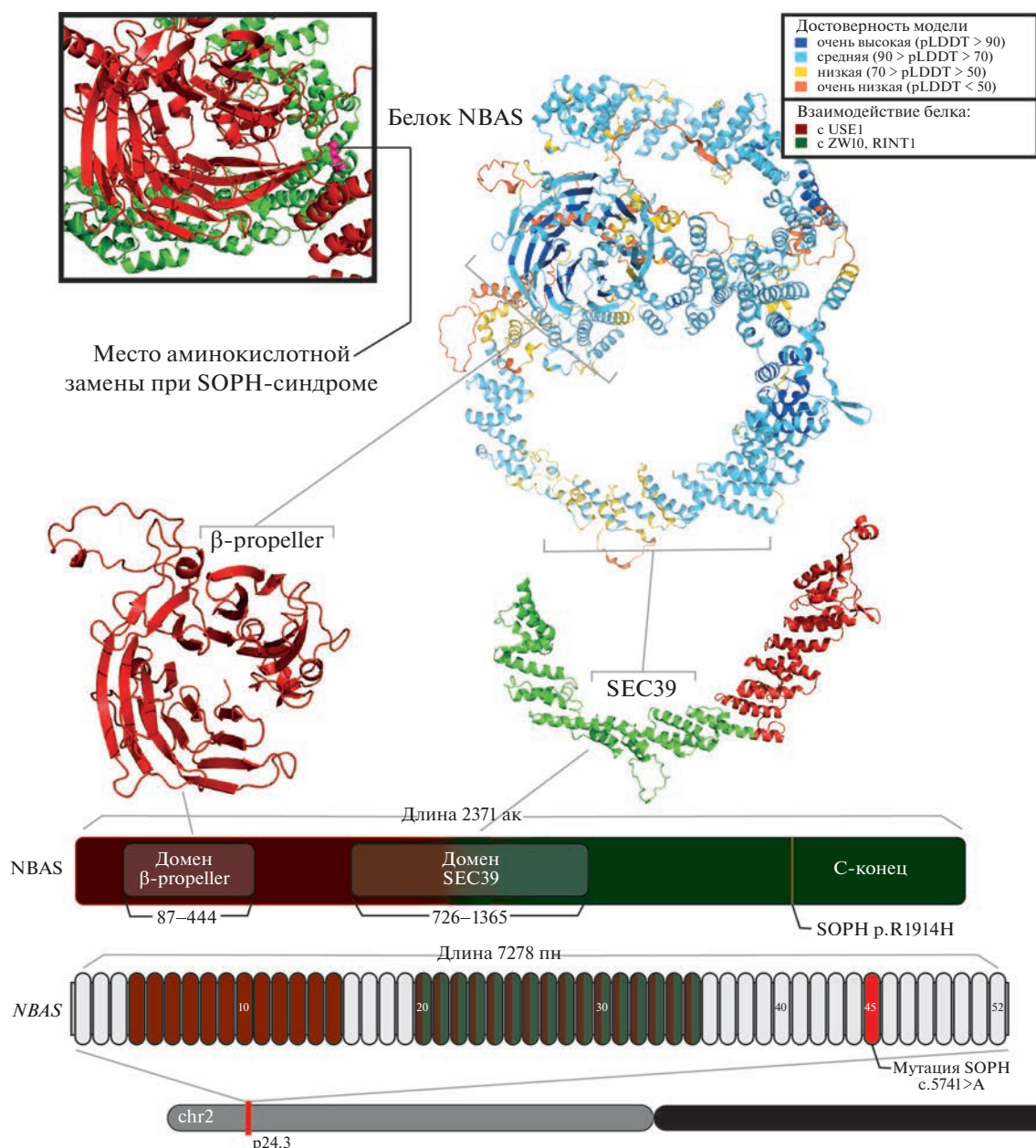


Рис. 1. Ген *NBAS* и белок с основными доменами с указанием миссенс-мутации SOPH (с.5741G>A, p.R1914N). *NBAS* расположен на коротком плече второй хромосомы, его длина 563278 пар нуклеотидов (пн), включает в себя 52 экзона. Каноничный транскрипт состоит из 7.3 тпн, из них 7.1 тпн являются кодирующими. Основными доменами считаются два: SEC39 и β -propeller. Регионы взаимодействия белка NBAS с основными партнерами указаны зеленым и красным цветом для ZW10, RINT1 и для USE1 соответственно. Трехмерная структура белка предсказана AlphaFold.

ЭР. Хотя белок NBAS является достаточно консервативным среди эукариотов, тем не менее размер белка очень сильно варьирует: от 82 кДа у дрожжей до 270 кДа у человека. Это связано с расширением N-конца — добавлением домена с β -пропеллером, и С-конца с пока что неясной функцией (кроме взаимодействия с белками-партнерами). Расширение гена может свидетельствовать о других функциях, которые выполняет данный ген помимо

ретроградного транспорта везикул, например об участии в нонсенс-опосредованном распаде РНК.

Есть несколько работ, исследующих нарушения в мембранном трафике, вызванные мутациями в *NBAS* [14, 17, 18]. Функциональными исследованиями на клетках HEK293T методом иммунофлуоресценции было показано изменение распределения белка NBAS с усилением свечения патогенного варианта, с мутацией в области домена SEC39, на ЭР в отличие от дикого типа, в то время как в ап-

парате Гольджи не было замечено видимых изменений между диким типом и мутантом. Однако аналогичное исследование, проведенное на клетках остеосаркомы Saos-2, выявило обратную картину: мутантный вариант теперь показывал низкое свечение у аппарата Гольджи в отличие от дикого типа, а изменений свечения между диким типом и мутантом в области ЭР не наблюдалось. Существующие данные могут свидетельствовать лишь о возможном нарушении ретроградного мембранного трафика при наличии патогенных вариантов в области домена SEC39 белка NBAS.

Исследования взаимодействия с белками-партнерами по ретроградному транспорту в клетках с мутантным вариантом NBAS в области С-конца также не выявили однозначных результатов. Тем не менее методом двойной иммунофлуоресценции на клетках HEK293T было обнаружено частичное снижение связывания белка NBAS, имеющего пропуск 48-го экзона, с ЭР в отличие от дикого типа [14].

С. Staufner с соавт. было проведено функциональное исследование фибробластов 14 пациентов с молекулярно-генетически подтвержденным ILFS2 [18]. Хотя и мутации находились в различных регионах гена и уже сами фибробласты имели сниженный уровень NBAS по сравнению с контролем, было обнаружено кратное уменьшение уровня белка NBAS при смене температурного режима с 37 до 40°C у мутантных фибробластов, в то время как на контрольных образцах повышение температуры не повлияло на уровень белка NBAS. Более того, изменение температуры также повлияло и на уровень роста клеток, снизив его у фибробластов пациентов. Далее методом двойной иммунофлуоресценции после пермеабиллизации было обнаружено значительное снижение свечения антител к ERGIC-53 и GPP130 у фибробластов пациентов по сравнению с контролем, данные мембранные белки локализуются на промежуточных компартментах между ЭР-аГ и аГ-эндосомой соответственно. Аналогичное исследование с KDELR и GM130 также выявило схожий эффект, но менее выраженный. Данные белки также являются маркерами мембранного трафика.

Тем не менее остается неясным как меняется мембранный трафик при миссенс-мутации, вызывающей SOPH-синдром. Так как данная мутация не затрагивает домен SEC39, связанный с мембранным трафиком, можно спекулятивно ожидать, что возможно мембранный трафик не будет нарушен, но возможна и ситуация, когда при наличии работающего трафика у клетки при мутации SOPH будет снижена толерантность к внешним экстремальным факторам, например повышению температуры, которое особенно у детей с еще неразвитым иммунитетом часто развивается и в повседневном нормальном развитии. Повышение

температуры, как было показано в исследованиях, уже являлось триггером острой печеночной недостаточности с нередким летальным исходом, возможно при SOPH-синдроме имеет место накопительный эффект от периодического повышения температуры. Учитывая относительно мягкие клинические проявления SOPH в отличие от ILFS2, исследования различий белковых взаимодействий NBAS при SOPH в этих двух температурных состояниях помогут найти подходы к терапии NBAS-ассоциированных патологий.

Роль NBAS в нонсенс-опосредованном распаде РНК

Nonsense Mediated Decay – это механизм контроля качества и регуляции мРНК на уровне трансляции белка на рибосомах, предотвращающий накопление неправильно собранных белков в клетке. NMD влияет на 5–10% экспрессирующихся генов у различных эукариот [19]. В основном считается, что NMD находит и предотвращает от трансляции транскрипты с преждевременными кодонами терминации (PTC, Premature Termination Codon), возникающие из-за мутаций, ошибок процессинга мРНК, приводящих, например, к ошибкам сплайсинга. Цели NMD не ограничиваются контролем PTC, также ими являются комплексы сращивания экзонов (EJC, Exon Junction Complex), расположенные ниже нетранслируемой области (табл. 1) Стоит отметить, что цели для деградации системой NMD принадлежат к эволюционно консервативным путям. Более того, были найдены вирусные транскрипты, являющиеся целями для распада, что наталкивает на более широкую зону ответственности данной системы, либо на ее низкую специфичность [19]. Составные части NMD – группа белков UPF (Up-Frameshift), их еще называют “коровыми” факторами NMD и белками, стимулирующими UPF к процессам распада транскриптов (SMG1, SMG6 и др.).

Пример механизма работы выглядит так: UPF1 и SMG1 вместе с другими факторами NMD образуют комплекс SURF (SMG-1–Upf1–eRF1–eRF3), распознающий PTC, и этот комплекс начинает свой дозор вдоль мРНК. При обнаружении PTC комплекс SURF с помощью дополнительных белков UPF2 и UPF3B связывается с EJC, находящимся ниже PTC, и вместе они образуют комплекс, индуцирующий распад РНК (DECID, decay-inducing complex), который инициирует фосфорилирование хеликазы UPF1 с помощью PI3K-подобной киназы (Phosphatidylinositol 3-Kinase-like kinases) SMG1 (Suppressor of Morphogenesis in Genitalia 1), после чего происходит рекрутирование распад-ассоциированных белков и начинается сам процесс. Белки UPF могут действовать вместе как в данном примере, но также показывают одиночную активность. Существует также и альтернативный способ активации NMD без контакта с

Таблица 1. Механизмы активации и функции NMD (адаптировано со статьи [41])

Роль NMD	Архитектура транскрипта	Механизм NMD
Контроль качества	Ошибка сплайсинга	Стимулированный комплекс срачивания экзонов (EJC)
	РТС во внутреннем экзоне	
	РТС во внешнем экзоне	Стимулированный длиной нетранслируемой области (3' UTR)
	Нарушенный поли-А конец	
Регуляция	Альтернативный экзон	Стимулированный комплекс срачивания экзонов (EJC)
	Короткие открытые рамки считывания	
	Удлиненный 3' конец нетранслируемой области	Стимулированный длиной нетранслируемой области (3' UTR)

EJC, который нацелен на транскрипты с удлиненным 3' UTR.

D. Longman с соавт. был обнаружен локальный путь ER-NMD, звеном которого является белок NBAS, модулирующий трансляцию белков клеточного стресса на ЭР [12]. Последовательный нокдаун генов мембранного трафика и NMD не выявил взаимосвязи этих двух процессов, подтверждая двоякую и при этом независимую роль NBAS, принимающего участие в обоих процессах. РНК-профилирование генов, связанных с нокдауном NBAS и UPF1, выявило кратные изменения экспрессии генов, связанных с клеточным стрессом ЭР, что может свидетельствовать о том, что при нарушении работы NBAS нарушается толерантность клетки к стрессовым факторам. Локализация трансляции регулируемых NBAS и UPF1 транскриптов именно в районе ЭР, а не в цитоплазме, была подтверждена методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Прямая связь NBAS–UPF1 с ЭР, а именно с его белком SEC61, формирующим канал транслокона, была показана методом PLA (proximity ligation assay). Результаты данных исследований могут являться подтверждением того, что NBAS находится в непосредственной физической близости к процессу трансляции, являющемуся активирующим фактором NMD.

Для того чтобы узнать на каком этапе происходит участие NBAS в процессе NMD, были использованы два мутантных варианта UPF1: в гипофосфорилированном состоянии, имитирующем состояния UPF1 в комплексе SURF, и гиперфосфорилированном состоянии для имитации состояния в комплексе DECID. Более предпочтительной связью для NBAS оказался комплекс SURF, образующийся на начальных этапах NMD, что может также свидетельствовать о том, что большинство регуляторных шагов процесса распада РНК проходит на начальных этапах. Интересно, что NBAS показывает временное взаимодействие и с SMG5, SMG6, SMG7, участвующими на более поздних этапах NMD.

Результаты данных исследований подтверждают непосредственное участие NBAS в процессах нонсенс-опосредованного распада РНК. Сложно сказать, где кончается функция контроля качества и начинается функция регуляции транскриптов [20]. Неясно и то, как система NMD “видит” свои цели для деградации, тем не менее считается, что белки-участники NMD могут распознавать конформацию рибонуклеопротеинов (mRNP, Messenger Ribonucleoprotein), несущих нарушенные мРНК. Как известно, мРНК после синтеза не перемещается до рибосомы в чистом виде, а нуждается в несущих белках-переносчиках, которыми выступают mRNP. Данный комплекс представляет из себя гранулы самособирающихся белков, содержащих РНК и РНК-связывающие белки. Одной из основных функций данного комплекса является пространственно-временная организация мРНК для дальнейшей трансляции [21]. При возникновении нарушений в структуре мРНК предполагается, что меняется и архитектура крепления мРНК к mRNP, что впоследствии распознается системой NMD.

При отсутствии или снижении функции NMD происходит накопление неправильно собранных белков в клетке, ассоциированных, например, с такими заболеваниями как болезнь Альцгеймера, Паркинсона и др. Тем не менее нет научных исследований того, как мутации, например при SOPH-синдроме, могут нарушить процесс NMD. Учитывая фундаментальную роль данного клеточного механизма, можно спекулятивно сказать, что патогенные варианты в NBAS не только сами могут накапливаться в клетке, нарушая ее работу, но и нарушенный NBAS сам не может выполнять свою роль в NMD по контролю качества транскриптов, что приводит к еще большему ущербу клетки. Все же даже если это так, то остается не совсем ясным почему одни мутации вызывают при малейшем клеточном стрессе летальный исход, а другие развиваются только с возрастом и, по-видимому, не имеют смертельных рисков.

Таблица 2. Клинические проявления трех генотип-фенотипических групп (1, 2, 3). Перечислены отдельные фенотипические признаки, характерные для одних и отсутствующие для других состояний, ассоциированных с мутациями в гене *NBAS* (адаптировано с работы [22])

Фенотипический признак	β -пропеллер (1)	SEC39 (2)	C-конец (3)
Эпизод острой печеночной недостаточности	Очень часто	Очень часто	Очень редко
Постоянно повышенные трансаминазы	Очень редко	Очень редко	Часто
Низкий рост	Часто	Редко	Очень часто
Остеопороз	Часто	Не обнаружено	Очень часто
Задержка закрытия родничка	Часто	Очень редко	Очень часто
Дисплазия тел позвонков, аномалии позвонка	Часто	Не обнаружено	Часто
Атрофия зрительного нерва	Очень редко	Не обнаружено	Очень часто
Задержка моторного развития	Часто	Очень редко	Очень часто
Нарушения интеллекта	Не обнаружено	Очень редко	Редко
Сенильная кожа	Редко	Очень редко	Часто
Низкий уровень IgG	Редко	Очень редко	У всех обнаруженных случаев
Низкий уровень NK-клеток	Часто	Часто	Очень часто
Пельгеровская аномалия лейкоцитов	Часто	Очень редко	Очень часто
Гипотония мышц	Редко	Очень редко	Очень часто
Скелетно-мышечная атрофия	Часто	Не обнаружено	Часто

Примечание. Очень часто – 75–100%, часто – 50–75%, редко – 25–50%, очень редко – 0–25%.

КЛИНИКА

Пациенты с мутацией в *NBAS* имеют большое фенотипическое разнообразие признаков, характеризующееся мультисистемным поражением органов и тканей. Ввиду относительной редкости данных наследственных патологий в мире в основном данные о пациентах из литературы можно получить от клинических случаев, которые не могут предоставить исчерпывающий систематический анализ спектра признаков при патогенных вариантах *NBAS*.

Тем не менее международный многоцентровой обзор имеющихся на тот момент научных данных о клинике мутаций *NBAS* 110 пациентов, проведенный С. Staufner с соавт., выявил генотип-фенотипическую зависимость локализации миссенс-мутаций или делеций от фенотипических проявлений [22]. Авторы выделили три генотип-фенотипические группы в зависимости от локализации мутации: группа с патогенными вариантами в регионе β -пропеллера (1), в регионе SEC39 (2) и на C-конце (3). Группа с мутациями

на С-конце включает SOPH-подобные состояния, группа SEC39 включает пациентов с ILFS2. Стоит отметить, что регион с β -пропеллером характеризуется перекрытием фенотипических признаков SOPH и ILFS2 (табл. 2). Данные исследования могут быть использованы для поиска подходов к терапии подобных состояний, так как зная регион мутации можно спрогнозировать predisposition к развитию острой печеночной недостаточности и начать своевременную поддерживающую терапию у данных пациентов [4, 23].

SOPH-синдром

В данный синдром изначально были включены пациенты с постнатальной гипоплазией, низким пропорциональным ростом, лицевыми дисморфиями с частичной атрофией зрительного нерва и пельгеровской аномалией лейкоцитов в общем анализе крови. При этом у данной группы были исключены эндокринологические патологии и отсутствовали интеллектуальные нарушения.

Дети с SOPH-синдромом рождаются в срок и с нормальными показателями роста и веса. Первые жалобы появляются после трехлетнего возраста на отставания в росте, частые простудные заболевания и снижение зрения. Фенотипические особенности характеризуются дряблой и старческой кожей, легким экзофтальмом, тонкими губами и пропорциональным туловищем при низком росте [1].

С появлением все более новых данных о пациентах с SOPH-подобными состояниями клинический спектр SOPH только расширяется, но основные фенотипические признаки, определенные в названии данного синдрома, как правило присутствуют [24, 25].

ILFS2

Синдром детской печеночной недостаточности 2-го типа является жизнеугрожающей патологией. По данным исследований в 50% всех случаев этиология острой печеночной недостаточности у детей остается неизвестной. Мутации в *NBAS* были ассоциированы с эпизодами RALF (Recurrent Acute Liver Failure). Прогноз для детей до года с RALF неблагоприятен. Зачастую единственный вариант лечения – трансплантация печени.

Клиника характеризуется частыми приступами печеночной недостаточности, тем не менее с возрастом частота эпизодов RALF спадает. Пациенты доставляются в клинику в тяжелом состоянии, характеризующемся рвотой и нарастающей вялостью. На лабораторных анализах повышены АЛТ и АСТ, обнаруживается тяжелая коагулопатия с печеночной желтухой. Интересно, что ЩФ и ГГТП как правило в пределах нормы [18]. Тем не менее если пациент выживает после приступа, то симптомы проходят через дни или недели с полным

восстановлением лабораторных показателей. Как правило первые эпизоды ILFS2 самые тяжелые.

Дополнительно к печеночному фенотипу также могут присутствовать кардиомиопатия, неврологические симптомы, а также синдромы поражения ЖКТ вместе с иммунологическими нарушениями.

Другие состояния, ассоциированные с NBAS

Обнаружены также несколько компаунд-мутаций, связанных с несовершенным остеогенезом и первичным иммунодефицитом у детей [26–31]. Помимо данных патологий мутации в гене также обнаруживались при таких состояниях как сахарный диабет 2-го типа, эпилепсия, синдром прерывания ножки гипофиза, атопический дерматит, акрофронтотрихоназальный дизостоз 1-го типа и др. [14, 32–39]. Список новых состояний, при которых обнаруживаются новые варианты *NBAS*, пополняется с каждым годом благодаря распространению в клинической практике технологии массового параллельного секвенирования.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА

На данный момент диагностика проводится методами ПЦР для скринингового поиска уже известных мутаций, в частности в диагностике SOPH. Секвенирование NGS используется при пограничных состояниях, когда поиск известных мутаций не дал положительных результатов и имеется перекрытие имеющихся симптомов с описанными ранее [17, 33, 40]. Функциональные исследования фибробластов также могут быть использованы для подтверждения дефицита белка NBAS, но по некоторым данным это может не обнаруживаться [24].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Белок NBAS играет двоякую роль в жизнедеятельности клетки, фенотипический спектр мутаций в гене *NBAS* также обладает широким полиморфизмом. Дальнейшие исследования, направленные на изучение патофизиологии каждого конкретного клинического синдрома, опираясь на имеющиеся фундаментальные знания о функции белка, помогут исследователям найти подходы к лечению данных и возможно на сегодняшний день еще неизвестных NBAS-ассоциированных состояний.

Коллектив авторов благодарит Анастасию Русанову за помощь и консультацию в графическом оформлении молекулярной структуры гена и белка NBAS.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации на тему: “Геноми-

ка Арктики: эпидемиология, наследственность и патология” (номер проекта № FSRG-2020-0014).

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

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Maksimova N., Hara K., Nikolaeva I. et al. Neuroblastoma amplified sequence gene is associated with a novel short stature syndrome characterised by optic nerve atrophy and Pelger-Huet anomaly // *J. Med. Genet.* 2010. V. 47. № 8. P. 538–548. <https://doi.org/10.1136/jmg.2009.074815>
2. Максимова Н.Р., Ноговицына А.Н., Куртанов Х.А., Алексеева Е.И. Популяционная частота и возраст мутации G5741 → А в гене NBAS, являющейся причиной SOPH-синдрома в республике Саха (Якутия) // *Генетика*. 2016. Т. 52. № 10. С. 1194–1201. <https://doi.org/10.7868/S0016675816090101>
3. Haack T.B., Stauffer C., Köpke M.G. et al. Biallelic mutations in NBAS cause recurrent acute liver failure with onset in infancy // *Am. J. Hum. Genet.* 2015. V. 97. № 1. P. 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.05.009>
4. Calvo P.L., Tandoi F., Haack T.B. et al. NBAS mutations cause acute liver failure: When acetaminophen is not a culprit // *Ital. J. Pediatr.* 2017. V. 43. № 1. P. 88. <https://doi.org/10.1186/s13052-017-0406-4>
5. Aoki T., Ichimura S., Itoh A. et al. Identification of the neuroblastoma-amplified gene product as a component of the syntaxin 18 complex implicated in golgi-to-endoplasmic reticulum retrograde transport // *Mol. Biol. Cell.* 2009. V. 20. № 11. P. 2639–2649. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-11-1104>
6. Longman D., Jackson-Jones K.A., Maslon M.M. et al. Identification of a localized nonsense-mediated decay pathway at the endoplasmic reticulum // *Genes Dev.* 2020. V. 34. № 15–16. P. 1075–1088. <https://doi.org/10.1101/gad.338061.120>
7. Scott D.K., Board J.R., Lu X. et al. The neuroblastoma amplified gene, NAG: Genomic structure and characterisation of the 7.3 kb transcript predominantly expressed in neuroblastoma // *Gene*. 2003. V. 307. P. 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(03\)00459-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(03)00459-1)
8. De Preter K., Speleman F., Combaret V. et al. Quantification of MYCN, DDX1, and NAG gene copy number in neuroblastoma using a real-time quantitative PCR assay // *Mod. Pathol.* 2002. V. 15. № 2. P. 159–166. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3880508>
9. Kaneko S., Ohira M., Nakamura Y. et al. Relationship of DDX1 and NAG gene amplification/overexpression to the prognosis of patients with MYCN-amplified neuroblastoma // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2007. V. 133. № 3. P. 185–192. <https://doi.org/10.1007/s00432-006-0156-y>
10. Wimmer K., Zhu X.X., Lamb B.J. et al. Co-amplification of a novel gene, NAG, with the N-myc gene in neuroblastoma: 1 // *Oncogene. Nature Publ. Group*. 1999. V. 18. № 1. P. 233–238. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202287>
11. Anastasaki C., Longman D., Capper A. et al. Dhx34 and Nbas function in the NMD pathway and are required for embryonic development in zebrafish // *Nucl. Acids Res.* 2011. V. 39. № 9. P. 3686–3694. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1319>
12. Longman D., Jackson-Jones K.A., Maslon M.M. et al. Identification of a localized nonsense-mediated decay pathway at the endoplasmic reticulum // *Genes Dev.* 2020. V. 34. № 15–16. P. 1075–1088. <https://doi.org/10.1101/gad.338061.120>
13. Jing H., Takagi J., Liu J. et al. Archaeal surface layer proteins contain β propeller, PKD, and β helix domains and are related to metazoan cell surface proteins // *Structure*. 2002. V. 10. № 10. P. 1453–1464. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(02\)00840-7](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(02)00840-7)
14. Palagano E., Zuccarini G., Prontera P. et al. Mutations in the neuroblastoma amplified sequence gene in a family affected by acrofrontofacionasal dysostosis type 1 // *Bone*. 2018. V. 114. P. 125–136. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.06.013>
15. Tagaya M., Arasaki K., Inoue H. et al. Moonlighting functions of the NRZ (mammalian Dsl1) complex // *Front. Cell Dev. Biol.* 2014. V. 2. <https://doi.org/10.3389/fcell.2014.00025>
16. Travis S.M., D'Amico K., Yu I.-M. et al. Structural basis for the binding of SNAREs to the multisubunit tethering complex Dsl1 // *J. Biol. Chem.* 2020. V. 295. № 30. P. 10125–10135. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013654>
17. Ritelli M., Palagano E., Cinquina V. et al. Genome-first approach for the characterization of a complex phenotype with combined NBAS and CUL4B deficiency // *Bone*. 2020. V. 140. P. 115571. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115571>
18. Stauffer C., Haack T.B., Köpke M.G. et al. Recurrent acute liver failure due to NBAS deficiency: phenotypic spectrum, disease mechanisms, and therapeutic concepts // *J. Inher. Metab. Dis.* 2016. V. 39. № 1. P. 3–16. <https://doi.org/10.1007/s10545-015-9896-7>
19. Kishor A., Fritz S.E., Hogg J.R. Nonsense-mediated mRNA decay: The challenge of telling right from wrong in a complex transcriptome // *WIREs RNA*. 2019. V. 10. № 6. <https://doi.org/10.1002/wrna.1548>
20. Isken O., Maquat L.E. The multiple lives of NMD factors: Balancing roles in gene and genome regulation // *Nat. Rev. Genet.* 2008. V. 9. № 9. P. 699–712. <https://doi.org/10.1038/nrg2402>
21. Buchan J.R. mRNP granules // *RNA Biol.* 2014. V. 11. № 8. P. 1019–1030. <https://doi.org/10.4161/15476286.2014.972208>

22. *Staufner C., Peters B., Wagner M. et al.* Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients // *Genet. Med.* 2020. V. 22. № 3. P. 610–621. <https://doi.org/10.1038/s41436-019-0698-4>
23. *Geem D., Jiang W., Rytting H.B. et al.* Resolution of recurrent pediatric acute liver failure with liver transplantation in a patient with NBAS mutation // *Pediatr. Transplant.* 2021. V. 25. № 7. P. e14084. <https://doi.org/10.1111/ptr.14084>
24. *Fischer-Zirnsak B., Koenig R., Alisch F. et al.* SOPH syndrome in three affected individuals showing similarities with progeroid cutis laxa conditions in early infancy // *J. Hum. Genet.* 2019. V. 64. № 7. P. 609–616. <https://doi.org/10.1038/s10038-019-0602-8>
25. *Li X., Cheng Q., Li N. et al.* SOPH syndrome with growth hormone deficiency, normal bone age, and novel compound heterozygous mutations in *NBAS* // *Fetal Pediatr. Pathol.* 2018. V. 37. № 6. P. 404–410. <https://doi.org/10.1080/15513815.2018.1509406>
26. *Khoreva A., Pomerantseva E., Belova N. et al.* Complex multisystem phenotype with immunodeficiency associated with NBAS mutations: reports of three patients and review of the literature // *Front. Pediatr.* 2020. V. 8. P. 577. <https://doi.org/10.3389/fped.2020.00577>
27. *Lenz D., Pahl J., Hauck F. et al.* NBAS variants are associated with quantitative and qualitative NK and B cell deficiency // *J. Clin. Immunol.* 2021. V. 41. № 8. P. 1781–1793. <https://doi.org/10.1007/s10875-021-01110-7>
28. *Balasubramanian M., Hurst J., Brown S. et al.* Compound heterozygous variants in NBAS as a cause of atypical osteogenesis imperfecta // *Bone.* 2017. V. 94. P. 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.10.023>
29. *Petukhova D.A., Gurinova E.E., Sukhomyasova A.L. et al.* Identification of a novel compound heterozygous variant in NBAS causing bone fragility by the type of osteogenesis imperfecta // *Bioinformatics Research and Applications / Eds Cai Z. et al.* Cham: Springer Intern. Publ. 2020. V. 12304. P. 38–43. https://doi.org/10.1007/978-3-030-57821-3_4
30. *Cotrina-Vinagre F.J., Rodríguez-García M.E., Martín-Hernández E. et al.* Characterization of a complex phenotype (fever-dependent recurrent acute liver failure and osteogenesis imperfecta) due to NBAS and P4HB variants // *Mol. Genet. Metab.* 2021. V. 133. № 2. P. 201–210. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2021.02.007>
31. *Ricci S., Lodi L., Serranti D. et al.* Immunological features of neuroblastoma amplified sequence deficiency: Report of the first case identified through newborn screening for primary immunodeficiency and review of the literature // *Front. Immunol.* 2019. V. 10. P. 1955. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01955>
32. *Suzuki S., Kokumai T., Furuya A. et al.* A 34-year-old Japanese patient exhibiting NBAS deficiency with a novel mutation and extended phenotypic variation // *Eur. J. Med. Genet.* 2020. V. 63. № 11. P. 104039. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2020.104039>
33. *Kim K.W., Myers R.A., Lee J.H. et al.* Genome-wide association study of recalcitrant atopic dermatitis in Korean children // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2015. V. 136. № 3. P. 678–684. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.03.030>
34. *Zou J., Zhao Z., Zhang G. et al.* MEFV, IRF8, ADA, PEPD, and NBAS gene variants and elevated serum cytokines in a patient with unilateral sporadic Meniere's disease and vascular congestion over the endolymphatic sac // *J. Otol.* 2022. <https://doi.org/10.1016/j.joto.2022.03.001>
35. *Mallakmir S., Nagral A., Bagde A. et al.* Mutation in the neuroblastoma amplified sequence gene as a cause of recurrent acute liver failure, acute kidney injury, and status epilepticus // *J. Clin. Exp. Hepatol.* 2019. V. 9. № 6. P. 753–756. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2019.03.008>
36. *Lipiński P., Greczan M., Piekutowska-Abramczuk D. et al.* NBAS deficiency due to biallelic c.2809C > G variant presenting with recurrent acute liver failure with severe hyperammonemia, acquired microcephaly and progressive brain atrophy // *Metab. Brain Dis.* 2021. V. 36. № 7. P. 2169–2172. <https://doi.org/10.1007/s11011-021-00827-z>
37. *Dayan R.R., Bignall O.N.R. II, Johnson S. et al.* Neuroblastoma amplified sequence gene mutations inducing acute kidney and liver injury in an adolescent female // *Case Rep. Nephrol. Dial.* 2020. V. 10. № 3. P. 117–123. <https://doi.org/10.1159/000508784>
38. *Costantini A., Valta H., Suomi A.-M. et al.* Oligogenic inheritance of monoallelic TRIP11, FKBP10, NEK1, TBX5, and NBAS variants leading to a phenotype similar to odontochondrodysplasia // *Front. Genet.* 2021. V. 12. P. 680838. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.680838>
39. *Brauner R., Bignon-Topalovic J., Bashamboo A. et al.* Pituitary stalk interruption syndrome is characterized by genetic heterogeneity // *PLoS One.* 2020. V. 15. № 12. P. e0242358. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242358>
40. *Zhernakova D.V., Brukhin V., Malov S. et al.* Genome-wide sequence analyses of ethnic populations across Russia // *Genomics.* 2020. V. 112. № 1. P. 442–458. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.03.007>
41. *Nasif S., Contu L., Mühlemann O.* Beyond quality control: The role of nonsense-mediated mRNA decay (NMD) in regulating gene expression // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2018. V. 75. P. 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.08.053>

The Function of the *NBAS* Has Been Revealed, Will the Same Happen with Its Multisystem Pathologies?

L. R. Zhozhikov^{a, *}, F. F. Vasilev^a, and N. R. Maksimova^a

^a*Ammosov North-Eastern Federal University in Yakutsk, Institute of Medicine, Yakutsk, 677013 Russia*

^{*}*e-mail: leonid.zhzhikov@gmail.com*

Mutations in the *NBAS* gene cause two groups of diseases — SOPH-syndrome and Infantile liver failure syndrome type 2 (ILFS2, RALF), which differ in clinical manifestations, course, and prognosis. In the current review we focused on clinical and genetic aspects of these pathologies and molecular biology of the *NBAS* protein, its retrograde membrane traffic and nonsense-mediated RNA decay.

Keywords: *NBAS* (*NAG*), membrane traffic, nonsense-mediated RNA decay (NMD), SOPH syndrome, infantile liver failure syndrome type 2 (ILFS2, RALF).

ОБЗОРНЫЕ
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 577.21:616.127

РЕГУЛЯТОРНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КО-ЛОКАЛИЗОВАННЫХ
С ГЕНАМИ КАРДИОМИОПАТИЙ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК¹

© 2023 г. А. Н. Кучер¹, М. С. Назаренко¹, *

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

*e-mail: maria.nazarenko@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 03.06.2022 г.

После доработки 28.07.2022 г.

Принята к публикации 05.09.2022 г.

Некодирующие РНК (нкРНК) играют важную роль в регуляции активности генов, значимых для развития и функционирования сердечно-сосудистой системы. Внутригенные нкРНК координированно регулируются и/или экспрессируются с их генами-хозяевами, включая нкРНК, гены которых локализованы в области генов кардиомиопатий (КМП). Обзор посвящен обобщению результатов исследований участия внутригенных нкРНК в функционировании сердца в норме и при развитии КМП различного генеза. К числу наиболее активно привлекавшихся к исследованию ассоциированных с КМП внутригенных нкРНК относятся микроРНК (miR-1, miR-133a, miR-208a, miR-208b, miR-324, miR-490, miR-499a) и длинные нкРНК (MHRT, TTN-AS1 и KCNQ1OT1). Установлено, что уровень данных нкРНК в миокарде характеризуется онтогенетической динамикой, зависит от пола и анатомического отдела сердца. Их экспрессия изменяется в миокарде/сыворотке крови у человека и модельных животных при воздействии экзогенных и эндогенных факторов, демонстрируя ассоциацию с клиническими особенностями при развитии и прогрессии КМП. Изменение уровня нкРНК до появления клинических признаков болезни, зарегистрированная возможность приостановки развития КМП и даже восстановление нормального фенотипа посредством управления уровнями данных регуляторных молекул свидетельствуют об их вовлеченности в патогенез заболевания. микроРНК и длинные нкРНК, гены которых перекрываются по локализации с генами КМП, участвуют в различных метаболических процессах, значимых для нормального функционирования сердца, в том числе посредством вовлеченности в эпигенетические процессы.

Ключевые слова: кардиомиопатии (КМП), микроРНК, длинные некодирующие РНК, внутригенные некодирующие РНК, ассоциированные с КМП.

DOI: 10.31857/S0016675823040057, **EDN:** AVMKVQ

Эпигенетические исследования, проводимые при различных заболеваниях сердечно-сосудистой системы, в том числе и при кардиомиопатиях (КМП), направлены на поиск как новых маркеров развития патологии, объясняющих развитие болезни и определяющих клинические особенности ее течения, так и возможных терапевтических мишеней [1–6]. К настоящему времени получен большой массив данных, свидетельствующих о разнообразных эпигенетических процессах, происходящих при развитии первичных (гипертрофической (ГКМП), дилатационной (ДКМП), аритмогенной (АКМП) КМП, некомпактного миокарда левого желудочка (НКМЛЖ)), и вторичных (ишемической, диабетической и др.) КМП в ткани миокарда и сыворотке крови индивидов [2, 3, 7].

Большое число исследований эпигенетических изменений в миокарде при развитии КМП выполнены на уровне модификации гистонов, метилирования ДНК и ремоделирования хроматина [7], а также при участии различных регуляторных некодирующих РНК [1, 2, 8, 9]. Эпигенетические модификации, которые выявляются в тканях сердца при КМП, оказывают влияние на экспрессию широкого спектра генов, вовлеченных в биохимические процессы и метаболические пути, значимые для развития и функционирования сердца (в том числе и при патогенезе), что указывает на неслучайность выявляемых транскриптомных изменений [10–13].

Примечательно, что некоторые гены (например, *EYA4*, *GATAD1*, *PRDM16*, *DMD*, *SLC25A4*, *ANKRD1*, *LMNA*, *TNNI3*), патогенные варианты которых приводят к развитию различных КМП, сами участвуют в эпигенетических процессах на уровне ме-

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0016675823040057 для авторизованных пользователей.

тирования ДНК, модификации гистонов и ремоделирования хроматина [7]. Кроме того, наблюдаются перекрытия по локализации между генами КМП и генами, кодирующими различные типы некодирующих РНК (ncRNA, **нкРНК**), обладающих регуляторным потенциалом. Это указывает на возможную значимость таких нкРНК в функционировании сердца и соответственно в развитии патологических процессов.

Цель настоящего обзора состоит в обобщении результатов исследований, посвященных изучению вовлеченности в патогенез патологии миокарда регуляторных нкРНК, гены которых локализованы в области генов КМП.

ГЕНЫ РЕГУЛЯТОРНЫХ нкРНК, ПЕРЕКРЫВАЮЩИЕСЯ ПО ЛОКАЛИЗАЦИИ С ГЕНАМИ КАРДИОМИОПАТИЙ

Установлено, что в пределах генов КМП локализованы гены различных регуляторных нкРНК, в том числе микроРНК, длинных некодирующих РНК (lncRNA, lncРНК), кольцевых РНК (circRNA, circРНК) (табл. 1). МикроРНК относятся к классу коротких интерферирующих РНК, размером менее 200 нуклеотидов (длиной в среднем 22 нуклеотида). Основная функция микроРНК заключается в регуляции экспрессии генов на посттранскрипционном уровне: связываясь со своими мишенями на матричной РНК (мРНК), они приводят к репрессии трансляции [23, 24]. Как правило, одна и та же микроРНК имеет сайты связывания на мРНК многих генов, а мРНК одного и того же гена, в свою очередь, способна связывать несколько различных микроРНК. Описаны также неканонические эпигенетические механизмы действия микроРНК: в ядре они могут участвовать в активации или подавлении транскрипции генов-мишеней [24]. То, что микроРНК играют критическую роль в обеспечении развития и нормального функционирования сердца, подтверждается наблюдениями, что специфичная для кардиомиоцитов делеция *Dgcr8* (гена, необходимого для биогенеза микроРНК) приводит к развитию полностью пенетрантного патологического фенотипа у мыши: развивается дисфункция левого желудочка, которая прогрессирует до ДКМП и ранней летальности [25], а также многочисленными клиническими наблюдениями и экспериментальными исследованиями.

К категории lncРНК относят РНК, размер которых превышает 200 нуклеотидов, они имеют сложную и пока еще не устоявшуюся классификацию [26, 27]. В качестве самостоятельного подтипа выделяют дивергентные lncРНК, которые транскрибируются в противоположном соседним генам направлении и могут вовлекаться в регуляцию их экспрессии [28]. Среди lncРНК, гены которых перекрываются по локализации с генами КМП, выделяют, например, *KCNQ1OT1* и

TTN-AS1. circРНК также относят к длинным нкРНК [29], включая подтип rt-circRNA (read through-circRNA), продуцирующийся из экзонов двух соседних генов одной и той же цепи [30, 31].

Длинные нкРНК могут обладать различными функциями: в ядре участвуют в регуляции транскрипции, в цитоплазме контролируют стабильность мРНК, выступают в качестве “губки” для микроРНК и других РНК, снижая тем самым их эффекты [23, 27]. При наличии и для lncРНК, и для мРНК общих элементов распознавания на микроРНК (microRNA recognition elements — MREs), lncРНК может конкурентно связываться с микроРНК, что будет приводить к усилению экспрессии генов-мишеней микроРНК (т.е. lncРНК могут выступать в качестве конкурирующей эндогенной РНК — competitive endogenous RNA, ceRNA, ceРНК). Согласованность сети lncРНК—микроРНК—мРНК влияет на функциональное состояние клетки, органа и организма в целом, и ее разбалансировка может лежать в основе развития патологии [32–35].

Одним из механизмов продуцирования регуляторных lncРНК является альтернативный сплайсинг. Например, сложный альтернативный сплайсинг характерен для мРНК гена кардиомиопатий *TTN*, который происходит при участии РНК-связывающего белка-20 (кодирует ген *RBM20*) [20, 36]. Для *TTN* идентифицировано 80 экспрессирующихся circРНК, уровень которых не коррелировал с уровнем экспрессии его гена-хозяина, но эффективность продуцирования данного класса молекул зависела как от структуры гена *TTN*, так и от функционирования участвующего в генерации circРНК гена *RBM20* [20]. Известно, что варианты в гене *RBM20* могут приводить к развитию различных форм КМП — прежде всего ДКМП, а также ГКМП, аритмогенной правожелудочковой КМП (АПЖКМП), НКМЛЖ [14–16]. На основании установления связи между метилированием ДНК гена *TTN-AS1* (специфичность метилирования которого наблюдали при ДКМП) и сплайсингом мРНК высказано предположение, что нарушение сплайсинга может вызывать пропуск экзонов при транскрипции *TTN*, особенно в той его области, которая входит в состав А-полос саркомера, что может имитировать фенотип ДКМП, наблюдаемый при наличии мутаций, приводящих к укорочению белка титина (*TTNtv*) [37]. В миокарде большое количество circРНК продуцируют гены *MYH6* и *MYH7* (в том числе circРНК, консервативные в миокарде человека, крысы и мыши), но из-за высокой гомологии между данными генами и увеличения вероятности артефактов авторы подчеркивают необходимость проведения более тщательных исследований [21].

Среди генов нкРНК, локализованных в области генов КМП, не все охарактеризованы с функ-

Таблица 1. Примеры генов регуляторных некодирующих РНК, локализованных в генах кардиомиопатий и вовлеченных в эпигенетическую регуляцию

Ген	Значимы для КМП [#] (по [14–16])	Гены нкРНК (название нкРНК согласно miRbase [17], RNACentral [18], Genecards [19])
<i>ACADVL</i>	ДКМП, ГКМП	<i>MIR324</i> (miR-324-5p, miR-324-3p)
<i>ANK2</i>	ДКМП, ГКМП, КМП	<i>MIR1243</i> (miR-1243), <i>MIR8082</i> (miR-8082), <i>ANK2-AS1</i> (ANK2-AS1)
<i>CACNB2</i>	ДКМП, АПЖКМП, ГКМП	<i>LOC107984213</i> (LOC107984213)
<i>CELSR3</i>	ГКМП	<i>MIR4793</i> (miR-4793-5p, miR-4793-3p)
<i>CHRM2</i>	ДКМП, КМП	<i>MIR490</i> (miR-490-5p, miR-490-3p), <i>LOC349160</i> (LOC349160)
<i>CRYAB</i>	ДКМП, ГКМП, КМП	<i>HSPB2-C1orf52</i> (HSPB2-C1orf52)
<i>CSRP3</i>	ДКМП, ГКМП, КМП	<i>CSRP3-AS1</i> (CSRP3-AS1)
<i>CTNNA3</i>	ДКМП, ГКМП, АПЖКМП, НКМЛЖ	<i>MIR7151</i> (miR-7151-5p, miR-7151-3p)
<i>DNAAF3</i>	ДКМП, РКМП, КМП	<i>DNAAF3-AS1</i> (DNAAF3-AS1)
<i>DMD</i>	ДКМП, ГКМП, АПЖКМП, РКМП, НКМЛЖ, КМП	<i>MIR3915</i> (miR-3915), <i>MIR548F5</i> (miR-548f-3p)
<i>JPH2</i>	ДКМП, ГКМП, НКМЛЖ	<i>LOC121853007</i> (LOC121853007), экспрессирует lncRNA
<i>KCND3</i>	ДКМП	<i>KCND3-AS1</i> (KCND3-AS1), <i>KCND3-IT1</i> (KCND3-IT1)
<i>KCNJ2</i>	ГКМП	<i>KCNJ2-AS1</i> (KCNJ2-AS1)
<i>KCNJ5</i>	ГКМП	<i>KCNJ5-AS1</i> (KCNJ2-AS1)
<i>KCNQ1</i>	ГКМП	<i>KCNQ1OT1</i> (KCNQ1OT1)
<i>LIPT2</i>	КМП	<i>LIPT2-AS1</i> (LIPT2-AS1)
<i>MYH6</i>	ДКМП, ГКМП, АПЖКМП, РКМП, НКМЛЖ, КМП	<i>MIR208A</i> (miR-208a-5p, miR-208a-3p), экспрессирует rt-circRNA*
<i>MYH7</i>	ДКМП, ГКМП, АПЖКМП, НКМЛЖ, РКМП	<i>MIR208B</i> (miR-208b-5p, miR-208b-3p), <i>MHRT</i> (MHRT), экспрессирует rt-circRNA*
<i>MYH7B</i>	ГКМП	<i>MIR499A</i> (miR-499a-5p, miR-499a-3p), <i>MIR499B</i> (miR-499b-5p, miR-499b-3p)
<i>MIB1</i>	ГКМП, НКМЛЖ, ДКМП ^{&}	<i>MIR133A1HG</i> (MIR133A1HG), <i>MIR133A1</i> (miR-133a-1, miR-133a-5p, miR-133a-3p), <i>MIR1-2</i> (miR-1-2, miR-1-3p)
<i>PRDM16</i>	ДКМП, ГКМП, РКМП, НКМЛЖ	<i>MIR4251</i> (miR-4251)
<i>RYR2</i>	ДКМП, ГКМП, АПЖКМП, НКМЛЖ, КМП	<i>MIR4428</i> (miR-4428)
<i>SHOC2</i>	ГКМП	<i>MIR548E</i> (miR-548e-5p, miR-548e-3p)
<i>SPATA13</i>	КМП*, НКМЛЖ*	<i>MIR2276</i> (miR-2276-5p, miR-2276-3p)
<i>SYNE2</i>	ДКМП, РКМП	<i>MIR548H1</i> (miR-548h-5p)
<i>TTN</i>	ДКМП, ГКМП, АПЖКМП, РКМП, НКМЛЖ	<i>TTN-AS1</i> (TTN-AS1), экспрессирует 80 circРНК

Примечание. Составлено по [14–22]. [#] Приведены КМП, для которых в указанных генах локализованы патогенные/вероятно патогенные варианты или варианты с неопределенной/конфликтной значимостью. Жирным шрифтом выделены формы КМП, генетические варианты которых зарегистрированы как в Simple ClinVar [14], так и в ClinGen [16]. ДКМП – дилатационная кардиомиопатия, КМП – кардиомиопатия, ГКМП – гипертрофическая кардиомиопатия, АПЖКМП – аритмогенная правожелудочковая кардиомиопатия, РКМП – рестриктивная кардиомиопатия, НКМЛЖ – некомпактный миокард левого желудочка. [&] Установлено только на животных моделях. * Неоднозначность результатов, по мнению авторов, возможно является артефактом [21].

циональной точки зрения. К числу наиболее изученных при КМП относятся гены микроРНК *MIR1-2* и *MIR133A1* (локализованы в интронах гена *MIB1*), *MIR208A* (в гене *MYH6*); *MIR208B* (в гене *MYH7*); *MIR490* (в гене *CHRM2*) и *MIR499A* (в гене *MYH7B*); гены lncРНК *MHRT* и *KCNQ1OT1*, перекрываются с генами *MYH7* и *KCNQ1* соответственно; а также *TTN-AS1* (перекрывается с геном *TTN*). Кодированные данными генами нкРНК (miR-1, miR-133a, miR-208a, miR-208b, miR-490, miR-499a, MHRT, KCNQ1OT1 и TTN-AS1) экспрессируются в клетках миокарда и вовлечены в обеспечение функционирования сердца в норме и при развитии патологических процессов на разных этапах онтогенеза [38–42].

нкРНК В СЕРДЦЕ В НОРМЕ И ПРИ КАРДИОМИОПАТИЯХ

Для ряда регуляторных нкРНК, гены которых располагаются в области генов КМП, установлены онтогенетическая и возрастная динамика экспрессии и функции, а также поло- и камеро-специфичные различия по уровню данных микроРНК в сердце [43–49]. Онтогенетическая динамика экспрессии характерна для lncРНК *Mhrt*: ее уровень возрастает в ходе дифференцировки кардиомиоцитов по мере развития сердца у эмбриона и в постнатальном периоде с увеличением возраста [45]. miR-1 и miR-133a контролируют преимущественно ранние стадии кардиогенеза, поддерживая детерминацию специфического для сердца мышечного клона из эмбриональных стволовых клеток и мезодермальных предшественников, а miR-208 и miR-499 участвуют на поздних стадиях кардиогенеза, опосредуя дифференцировку кардиоцитов в кардиомиоциты и спецификацию быстрых/медленных мышечных волокон [50]. Экспрессия miR-208b снижается в ходе развития эмбриона мыши и в сердце взрослой особи, в норме эта микроРНК не выявляется [51]. miR-208a, miR-208b и miR-499, гены которых перекрываются с генами *Myh6*, *Myh7* и *Myh7b* соответственно, относятся к одному семейству микроРНК, причем miR-208b и miR-499 функционально дублируют друг друга [43].

В сердце взрослых мышей происходит совместная экспрессия miR-208a и ее гена-хозяина *Myh6*, а miR-208a, в свою очередь, регулирует экспрессию двух медленных миозинов и их интронных микроРНК, *Myh7* и miR-208b, *Myh7b* и miR-499 [43], но экспрессия miR-208b может также происходить независимо от экспрессии гена-хозяина *Myh7* [52]. С другой стороны, miR-208b и ее предшественник pri-miR-208b участвуют в регуляции экспрессии генов *MYH6* и *MYH7*, в том числе посредством вовлечения в эпигенетическую регуляцию на уровне метилирования/ацетилирования ДНК [53, 54]. В частности, повышенная экс-

прессия pri-miR-208b способствует взаимодействию метилтрансферазы гистонов Ezh2 с межгенным двунаправленным промотором, происходит метилирование H3K27m3, что приводит к подавлению экспрессии генов, кодирующих MYH7 (α -МНС) и антисмысловой транскрипт MYH6 (β -МНС), вследствие чего развивается гипертрофия сердца [53]. С другой стороны, при использовании ингибиторов гистоновой деацетилазы наблюдали гиперацетилирование межгенного двунаправленного промотора (которое сопровождалось высвобождением комплекса Ezh2/pri-miR-208b) и восстановление экспрессии генов α -МНС и β -МНС [53]. Подавление pri-miR-208b приводит к изменению экспрессии Ezh2-регулируемых генов, среди которых – *Anp*, *Bnp*, *Tgfb3*, *Spp1*, а также β -МНС и α -МНС.

На модельных объектах в левом желудочке сердца установлены различия между полами по уровню экспрессии pri-miR-208b и гена *Myh6* (более высокие уровни экспрессии показаны для самок при отсутствии различий по уровню метилирования CpG-сайтов промотора *pri-miR-208b* между полами), тогда как уровень экспрессии зрелой miR-208b, а также *Mhrt* и гена *Myh7* у представителей разных полов был сопоставим [47]. Различия в экспрессии pri-miR-208b в сердце между полами могут быть связаны с поло-специфичными эпигенетическими процессами, происходящими на уровне РНК и ДНК. В регуляции экспрессии miR-208b участвует lncРНК *Mhrt* (ген-хозяин данной lncРНК – *Myh7*), для которой установлено специфическое для полов метилирование, что определяет характер взаимодействия считывающего метилирование белка MeCP2 на промоторе *pri-miR-208b*. Так как в сердце самцов lncРНК *Mhrt* в позиции CG18 неметилирована, MeCP2 и белковый корепрессорный комплекс (состоит из Brg1, Rest, Hdac2) взаимодействуют с промотором *pri-miR-208b*, что приводит к репрессии транскрипции; в сердце самок позиция CG18 метилирована и наблюдается ее обогащение MeCP2, что позволяет транскрипцию *pri-miR-208b* [47]. Различия по уровню экспрессии в левом желудочке сердца между полами зарегистрированы и для других микроРНК как в норме, так и при КМП (в частности, при ишемической КМП), причем спектр дифференциально экспрессирующихся микроРНК специфичен при разных функциональных состояниях (у человека различия по уровню между полами зарегистрированы в норме для 15 микроРНК, при ишемической КМП – для трех микроРНК) [55].

Для семейства miR-208 зарегистрирована также заметная камерная специфичность экспрессии: miR-208a-3p и miR-208a-5p в изобилии представлены в левых предсердиях сердца, тогда как miR-208b-3p и miR-208b-5p преимущественно выявлялись в левых желудочках (аналогичная ситуация наблюдалась и для их генов-хозяев – α -МНС

(*МУН6*) и β -*МНС* (*МУН7*) соответственно) [46]. Камерная специфичность экспрессии зарегистрирована и для других микроРНК, в том числе и в ответ на воздействие кардиотоксичных препаратов [56].

Длинные нкРНК также модулируют экспрессию и функцию генов в развивающемся сердце, в том числе и путем вовлечения в широкий спектр эпигенетических процессов. В регионе гена *Kcnqlot1* (антисмыслового транскрипта, локализованного в импринтированном регионе гена *KCNQ1*, который играет важную роль в развитии и функционировании сердца) выявлено множество энхансеров, в том числе и значимых для регуляции экспрессии его гена-хозяина *Kcnq1* в сердце [57]. Уровни *Kcnqlot1* обратно коррелируют с уровнем *Kcnq1* во многих тканях, на основании чего высказано предположение, что экспрессия данных генов является взаимоисключающей, при этом отмечают тенденцию к более высокой экспрессии *Kcnqlot1* в эмбриональных тканях по сравнению с тканями взрослого организма [57]. Установлено также, что экспрессирующиеся продукты области *Kcnqlot1* по молекулярной структуре, количеству и сложности различаются на разных этапах онтогенеза [57]. Кроме того, по мере развития сердца в миокарде экспрессия *Kcnqlot1* переключается на двуаллельную: происходит активация материнского транскрипта *Kcnqlot1* (который короче отцовского); его активация зависит от альтернативного сайта начала транскрипции, находящегося ниже CpG-островков, что позволяет таким образом обходить метку метилирования ДНК [44].

Характер взаимодействия между *Kcnqlot1* и его геном-хозяином *Kcnq1* также отличается на разных этапах онтогенеза: на ранних этапах в сердце импринтинг *Kcnq1* устанавливается и поддерживается независимо от экспрессии данной лнсРНК, но на более поздних стадиях развития *Kcnqlot1* участвует в модуляции уровней *Kcnq1*, так как отсутствие данной антисмысловой нкРНК ведет к сверхэкспрессии *Kcnq1*, что сопровождается aberrантной трехмерной структурой хроматина [44]. То, что *Kcnqlot1* модулирует трехмерную конформацию хроматина, отмечали и другие исследователи [58]. Являясь лнсРНК, *KCNQ1OT1* может вовлекаться в различные метаболические процессы, выступая в качестве конкурирующей эндогенной РНК для широкого спектра микроРНК.

Известно, что КМП являются возраст-зависимыми патологиями, регистрируются также различия в клинической картине между мужчинами и женщинами [59–61]. Кроме того, в ряде случаев имеет место специфичность поражения различных отделов сердца при разных типах КМП (например, чаще регистрируют аритмогенную кардиомиопатию правого желудочка, некомпактный миокард левого желудочка, по сравнению с пора-

жением других отделов сердца). Описанные выше различия по уровню экспрессии нкРНК, гены которых располагаются в области генов КМП (возрастные особенности, различия между полами, камерная специфичность), представляют интерес с точки зрения объяснения особенностей клинической картины развития заболеваний миокарда. Кроме того, приведенные данные свидетельствуют о том, что регуляторные нкРНК являясь эпигенетическими маркерами вовлекаются в широкий спектр других эпигенетических процессов, имеющих важное значение для нормального функционирования сердца и развития патологических состояний.

ЭКСПРЕССИЯ нкРНК В МИОКАРДЕ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ КАРДИОМИОПАТИЯХ

Для нкРНК, гены которых локализуются в области генов КМП, зарегистрированы изменения экспрессии в миокарде и сыворотке крови при развитии различных КМП, а также установлена их ассоциированность с признаками, отражающими функциональное состояние сердца у человека и модельных животных (см. Приложение, составлено по [39, 46, 53, 54, 62–92]). Такие данные получены для микроРНК *miR-1*, *miR-133a*, *miR-208a*, *miR-208b*, *miR-324*, *miR-490*, *miR-499a* и лнсРНК – *KCNQ1OT1*, *MHRT* и др. Различия по уровню экспрессии микроРНК регистрировали при ГКМП, ДКМП, АПЖКМП, ишемической, диабетической и других формах КМП по сравнению с контролем или с другими заболеваниями сердечно-сосудистой системы, а также между различными формами КМП.

При развитии КМП для большинства привлеченных к анализу микроРНК наблюдали разнонаправленные изменения уровня экспрессии в миокарде (сыворотке) по сравнению с непораженными тканями, за исключением *miR-490* (более низкий уровень в миокарде выявлен у пациентов с ишемической и неишемической КМП), *miR-499* (увеличение уровня в клетках миокарда при ДКМП и ГКМП у человека) и *miR-324* (более высокие уровни в сыворотке крови при идиопатической и ишемической ДКМП) (рис. 1; приложение). Следует, однако, отметить, что число исследований *miR-490*, *-499* и *-324* при КМП относительно невелико.

Для других микроРНК регистрировали разнонаправленные изменения уровня при развитии разных форм КМП, а также противоречивые результаты при исследовании одной и той же кардиомиопатии (рис. 1; Приложение). Так, и снижение, и увеличение уровня микроРНК по сравнению с контролем регистрировали для *miR-1* при ГКМП, ДКМП, для *miR-133a* – при ГКМП, для *miR-208a* и *miR-208b* – при ДКМП. В некоторых случаях разнонаправленные изменения уров-

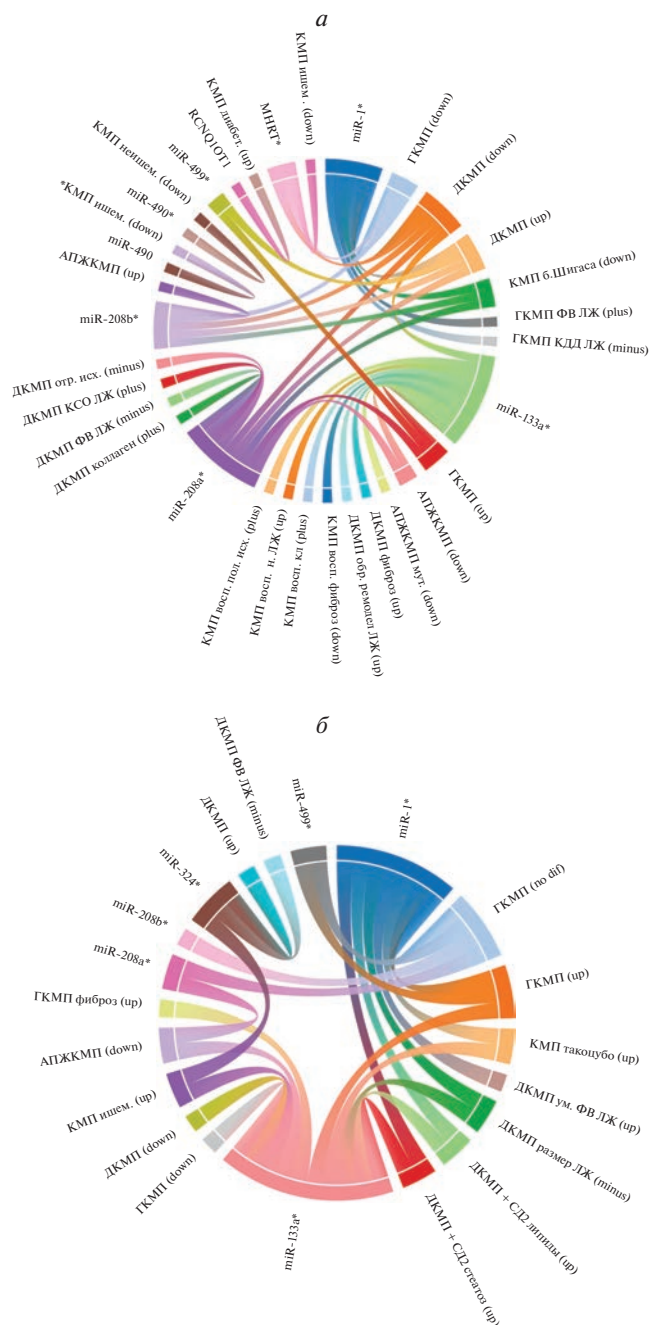


Рис. 1. Ассоциация экспрессии нкРНК в миокарде (а) и сыворотке крови (б) с кардиомиопатиями и клинически значимыми признаками у человека. * – нкРНК; up/down/no dif – увеличение/снижение/нет различий уровня нкРНК при КМП по сравнению с контролем; plus/minus – положительная/отрицательная корреляция уровня нкРНК с эндотипом КМП. Детали – см. приложение.

ня микроРНК при одной и той же патологии могут быть связаны с возрастными особенностями анализируемых выборок, как, например, для miR-1 и miR-208a-5p при ДКМП у детей и взрослых [64, 72], но и для выборок взрослых индивидов также наблюдали разнонаправленные изменения уровня микроРНК при одной и той же КМП (рис. 1; Приложение).

МикроРНК miR-1 наиболее представлена в миокарде, на ее долю приходится 40% всей микроРНК [25], и она часто привлекалась к анализу при исследовании КМП. Помимо ДКМП и ГКМП от контроля отличался уровень miR-1 при КМП такоцубо (более высокий уровень в сыворотке крови) [65], а также при КМП у пациентов с хронической болезнью Шагаса (более низкий уровень в

миокарде) [64]. Для miR-133a наряду с КМП, для которых зарегистрирован измененный уровень экспрессии miR-1 (за исключением КМП при хронической болезни Шагаса), отличия установлены для АПЖКМП, ишемической и воспалительной КМП (рис. 1; приложение). Интересно, что более низкий уровень miR-133a установлен не только у пациентов с АПЖКМП, в том числе у обладателей редких вариантов в генах *DSP*, *PKP2* и *JUP*, но и у бессимптомных носителей данных вариантов среди членов семей, отягощенных данной патологией [84].

Несмотря на то что гены miR-1 и miR-133a имеют общий ген-хозяин (*MIB1*) и экспрессируются с одного транскрипта, для них регистрируются неоднозначные, а иногда и разнонаправленные изменения экспрессии при одной и той же КМП (рис. 1; Приложение). Например, в сыворотке крови у пациентов с ГКМП наблюдали повышенный уровень miR-133a и снижение уровня miR-1 (на уровне тенденции), что по мнению некоторых исследователей [66] может быть следствием их экспрессии в разных типах клеток и соответственно отражать вовлеченность в различные внутриклеточные метаболические процессы и разную функциональную значимость.

Для miR-208a и miR-208b наблюдали отклонения в уровне экспрессии в миокарде при ГКМП, ДКМП, АПЖКМП и КМП у пациентов с хронической болезнью Шагаса (рис. 1; Приложение). Также регистрировали увеличение уровня miR-499 в клетках миокарда при сердечной недостаточности и гипертрофии сердца у человека, которое было более выражено, чем для miR-208 [88].

Кроме того, различия по уровню экспрессии микроРНК установлены между образцами миокарда (реже образцами сыворотки крови) пациентов с различными формами КМП, причем различия наблюдали даже в случае однонаправленного изменения экспрессии при КМП по сравнению с контролем (приложение). Например, более низкие уровни miR-1 выявлены в миокарде пациентов и с ГКМП, и с ДКМП, но в связи с разным уровнем снижения данной микроРНК по сравнению с контрольными образцами регистрировались также значимые различия и между этими формами КМП [69]. Различия по уровню miR-324 в сыворотке крови установлены между пациентами с идиопатической и неидиопатической ДКМП, при том что для них показаны более высокие уровни данной микроРНК по сравнению со здоровыми индивидами [71].

По уровню экспрессии микроРНК в миокарде пациенты с КМП также отличались от лиц с другими заболеваниями сердечно-сосудистой системы: для miR-133 различия зарегистрированы между КМП такоубо и инфарктом миокарда с подъемом зубца ST, между ДКМП и КМП у пациентов

с хронической болезнью Шагаса и др. (приложение). Пациенты с АПЖКМП отличались по уровню экспрессии в перикардиальной жидкости miR-1-3p по сравнению с пациентами с постинфарктной желудочковой тахикардией [73]. Уровни экспрессии шести микроРНК, включая miR-133a, были информативными для дифференциации пациентов с АПЖКМП от здоровых индивидов, пациентов с другими КМП (ГКМП, ДКМП) и другими заболеваниями сердца (синдром Бругада, миокардитом), а также от здоровых членов семьи с АПЖКМП, являющихся носителями патогенных вариантов в демосомных генах [84]. Различия по уровню экспрессии в клетках миокарда установлены для miR-490-3p между пациентами с ишемической и неишемической КМП [87].

Важно подчеркнуть, что данные по изменению уровня экспрессии микроРНК в миокарде не всегда согласуются с оценками, полученными в образцах сыворотки крови даже для одних и тех же пациентов (рис. 1; табл. Приложение). Например, снижение уровня miR-1 и увеличение уровня miR-208a регистрировали в миокарде, но не в сыворотке крови [70]; уровень miR-133 в миокарде (но не в сыворотке) был предиктором комбинированной конечной точки у пациентов с ДКМП [82]. В то же время у пациентов с АПЖКМП уровень miR-133a-3p снижался в образцах и крови, и миокарда, причем даже независимо от наличия/отсутствия редких вариантов в демосомных генах [84].

Для микроРНК установлена также ассоциированность с характером течения КМП (наличие фиброза, выживаемость, бессобытийность), ЭХО-кардиографическими параметрами, отражающими функциональное состояние сердца (рис. 1; табл. Приложение), что свидетельствует в пользу неслучайности выявленной динамики изменения уровня микроРНК при развитии КМП.

Несмотря на то что результаты исследований, выполненных на животных, не всегда соответствуют данным, полученным при обследовании человека, они существенно расширяют представления о значимости микроРНК в развитии различных КМП. Так, в дополнение к данным, полученным при обследовании человека, показано, что изменение уровня анализируемых микроРНК наблюдалось при воздействии различных провоцирующих развитие КМП стимулов, в том числе — мутаций в генах КМП (трансгенные животные); химических веществ (стрептозотоцин, фенантрен), механических (поперечное сужение аорты), стресса, параллельно с развитием патологических изменений в сердце, соответствующих различным КМП — ГКМП, АПЖКМП, диабетической КМП, а их уровень коррелировал с патофизиологическими признаками и клиническими особенностями (рис. 2; Приложение).

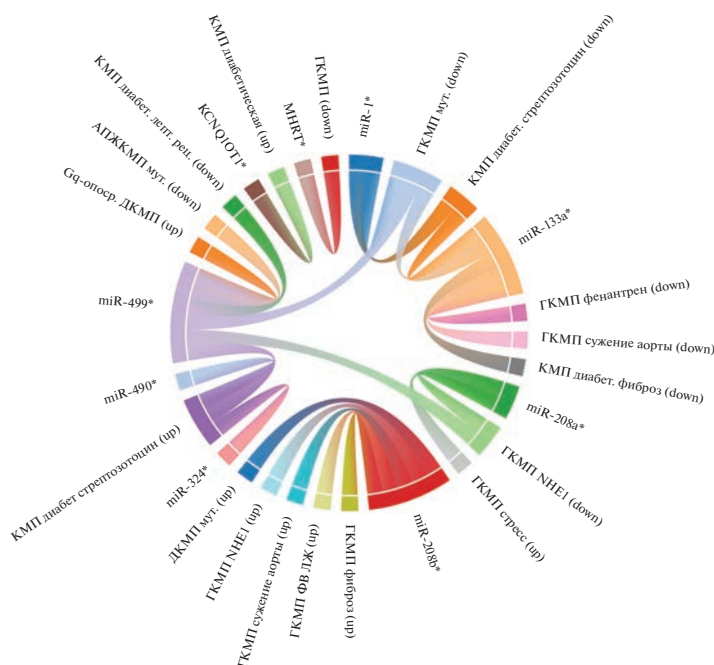


Рис. 2. Уровень экспрессии нкРНК в миокарде у животных (мышь) при моделировании КМП. * – нкРНК; up/down – увеличение/снижение уровня нкРНК при КМП по сравнению с контролем. Детали – см. Приложение.

Для miR-499 на моделях животных были получены результаты, отличающиеся от таковых у человека (рис. 1 и 2; приложение). На мышинной модели (miR-499-трансгенные мыши) показано, что miR-499 индуцировала прогрессирующее увеличение сердца и сократительную дисфункцию, и с возрастом у таких особей развивалась ДКМП [88]. Однако снижение miR-499 в миокарде зарегистрировано у трансгенных мышей со специфичной для кардиомиоцитов сверхэкспрессией гена *DSG2*, несущего нонсенс-мутацию p.Gln558Ter, характерную для аритмогенной кардиомиопатии у человека [89], у трансгенных мышей, несущих двойную мутацию в генах ГКМП (p.Gly203Ser в *TnI* и p.Arg403Gln в *Myh6*) [63], и у мышей, страдающих диабетической КМП, с дефицитом лептиновых рецепторов [90], тогда как уровень данной микроРНК был повышен в миокарде мышей с диабетической КМП, индуцированной стрептозоточином [67] и при Gq-опосредованной КМП [88]. Эти данные свидетельствуют о том, что направленность изменения уровня экспрессии микроРНК может не только различаться при разных типах КМП, но и зависеть от стимула (как эндогенного, так и экзогенного), вызвавшего развитие патологии.

Только на основании уровня экспрессии нкРНК нельзя сделать заключение об их участии в патогенезе болезни. Однако для рассматриваемых нкРНК была установлена вовлеченность в регуляцию экспрессии генов в миокарде. Изме-

нение уровня miR-208a, miR-208b, miR-499 влияло на экспрессию в сердце генов, имеющих мишени для данных микроРНК (в том числе и транскрипционных факторов) [51, 88]. Так, активация miR-499 способствовала развитию сердечной недостаточности посредством прямой регуляции 67 первичных мРНК-мишеней и косвенной регуляции большого количества мРНК и белков сердца [88].

Кроме того, доказательства вовлеченности данных микроРНК в патогенез КМП получены на клиническом и молекулярно-генетическом уровнях. На животных моделях показано, что снижение уровней miR-1 и miR-133a в миокарде происходит на стадии, предшествующей ГКМП, и это предполагает их участие в раннем этапе развития болезни (рис. 2; приложение) [63]. Уровень miR-133 не только различался между пораженными и непораженными фиброзом участками сердца пациентов с ДКМП [81], но определял молекулярно-генетические преобразования при развитии данного патологического процесса. Так, на модельных животных и у пациентов с ГКМП показано, что уровень miR-133a был обратно пропорционален количеству фактора роста соединительной ткани (CTGF), выполняющего ключевую роль в процессе фиброза (на мРНК CTGF доказано наличие мишеней для miR-133a) [93]. У мышей с диабетической КМП, вызванной приемом стрептозоточина, в миокарде наблюдали снижение уровня miR-133a, что сопровождалось увеличением мРНК

коактиватора транскрипции E2F3, основных маркеров фиброза (трансформирующего фактора роста- β 1, фактора роста соединительной ткани, фибронектина (FN1) и COL4A1) и увеличением очагового фиброза, тогда как сверхэкспрессия сердечной miR-133a снижает уровни мРНК маркеров фиброза в сердце мыши с диабетом [76]. Однако не во всех исследованиях подтверждена связь данной микроРНК с фиброзом [82]. Кроме того, miR-133a, уровень которой изменяется в миокарде и сыворотке крови при КМП, развивающихся вследствие инфекционных процессов, в том числе и при COVID-19, коррелировал не только с морфофункциональными параметрами сердца, но и с клеточными и биохимическими маркерами воспаления [79, 83, 94].

Повышение уровня экспрессии miR-208a в миокарде было достаточно, чтобы развилась гипертрофия сердца, тогда как ингибирование данной микроРНК ослабляло индуцированную стрессом гипертрофию и ремоделирование сердца [38, 42]. Высокий уровень miR-208a не только вызывал гипертрофию миокарда и развитие аритмии, но также влиял на электрофизиологию и эхокардиографические показатели сердца [38, 42, 51]. Для miR-208a также установлена корреляция с уровнем мРНК β -МНС (*Myh7*), объемом миокардиального коллагена, с неблагоприятными клиническими исходами [85]. Повышенная экспрессия miR-208b в миокарде приводила у мышей к гипертрофии сердца, но подавление данной микроРНК предотвращало переход адаптивного ремоделирования в неадаптивное в мышечной модели ДКМП, связанной с нарушением работы гена *Ttn* (рис. 2; приложение) [54].

Для lncРНК *MIHRT* и *KCNQ1OT1* также установлены изменения уровня экспрессии при развитии КМП (рис. 1 и 2; Приложение). В частности, зарегистрировано снижение в клетках миокарда уровня *MIHRT* на 82,8, 72,8 и 65,9% при ГКМП, ишемической КМП и идиопатической ДКМП соответственно [39]. У пациентов с гипертонической болезнью в мононуклеарах крови наблюдали более высокий уровень *MIHRT*, который значимо отрицательно коррелировал с индексом массы миокарда левого желудочка [95]. Несмотря на то что гены lncРНК *Mhrt* и микроРНК miR-208b расположены в области одного и того же гена КМП (*Myh7*), они оказывают разное влияние в отношении функционирования сердца: при перегрузке давлением *Mhrt* обладает защитным эффектом, тогда как miR-208 — неблагоприятным эффектом на сердце [39, 51, 96].

Участие в развитии гипертрофии миокарда показано для днРНК *Kcnq1ot1*. *Kcnq1ot1* выступает в качестве эндогенной конкурирующей РНК, фор-

мируя ось *Kcnq1ot1*/miR-30e-5p/ADAM9: при секвестировании miR-30e-5p увеличивается экспрессия ADAM9 и происходит репрессия ангиотензин-II-индуцированного гипертрофического фенотипа в кардиомиоцитах [97].

Функциональная значимость *TTN-AS1* исследовалась в основном при онкологических заболеваниях, в которых показано, что она может действовать как ceРНК, вовлекаясь в различные метаболические пути, в том числе и значимые для сердечно-сосудистой системы. В частности, *TTN-AS1* выступает в качестве “губки” для miR-142-5p (которая регулирует уровень экспрессии циклинзависимой киназы 5 — CDK5) [98], для miR-573 (регулирует уровень экспрессии транскрипционного фактора E2F3) [99], для miR-376b-3p (регулирует уровень экспрессии репрессора транскрипции KLF12) [100], для miR-153-3p (регулирует уровень экспрессии фермента ZNRF2, необходимого для активации PI3K/Akt/mTOR метаболического пути) [101]. Среди этих микроРНК для miR-142 установлено изменение уровня в сыворотке крови детей с ДКМП [102], при развитии аритмогенной КМП по сравнению как с контролем, так и с другими КМП и заболеваниями сердечной мышцы [84]; у пациентов с семейной ДКМП, связанной с мутациями в гене *LMNA*, и у носителей данных мутаций без клинических проявлений [103]; у пациентов с тяжелым по сравнению с умеренным течением ДКМП [71]. Для miR-376b-3p установлена дифференциальная экспрессия в миокарде при КМП правого желудочка, индуцированной трикуспидальной регургитацией, по сравнению с нормальным миокардом (в данном случае установлена регуляторная ось с участием и данной микроРНК, и *TTN-AS1* — *TTN-AS1*/hsa-miR-376b-3p/TRPM5) [101].

При КМП (в частности, при ДКМП) нарушается продуцирование сiсРНК из генов, патогенные мутации в которых приводят к КМП, в том числе — из генов *TTN* и *RYR2* [20, 21]. В интронах генов, связанных с кардиомиопатиями (например, *TTN*, *ACTC1*, *TPM1*, *JPH2*, *ANKRD1*, *DTNA*, *TMPO* и *FHL2*), локализованы и другие lncРНК, которые дифференциально экспрессировались в миокарде между пациентами с ГКМП и здоровыми индивидами [22].

Таким образом, уровни микроРНК и днРНК, гены которых локализуются в области генов КМП, изменяются в миокарде и в сыворотке крови при развитии кардиомиопатий, но эти изменения не всегда воспроизводятся или даже могут носить разнонаправленный характер.

ВОЗМОЖНЫЕ ПРИЧИНЫ ПРОТИВОРЕЧИВОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ ОЦЕНКИ УРОВНЯ микроРНК И lncРНК В МИОКАРДЕ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ КАРДИОМИОПАТИЯХ

Противоречивость результатов изменения уровня микроРНК при КМП, полученных в разных исследованиях, может быть связана с различиями по полу и возрасту, стадии болезни индивидов, участвующих в исследовании, по участкам миокарда, в которых проводился молекулярный анализ, а также может быть следствием эффектов эндогенных и экзогенных средовых факторов.

На мышинной модели ГКМП (мышцы с мутациями p.Gly203Ser в тропонине I (TnI-203) и p.Arg403Gln в тяжелой цепи α -миозина (MHC-403)) показано, что изменения экспрессии miR-1 и miR-133a в миокарде желудочков регистрируются еще до начала развития гипертрофии (которое для miR-1 сохраняется на всех стадиях — ранней, стабильной и конечной), тогда как снижение miR-499-5p выявлено только на конечной стадии болезни [63]. При ДКМП в верхушке сердца выявили снижение уровня ряда микроРНК (в том числе и miR-133a), тогда как в перегородке сердца между пораженными ДКМП и здоровыми сердцами различий не было выявлено [81]. Кроме того, для ряда микроРНК (miR-1, miR-133a, miR-208a, miR-324) установлены корреляции с параметрами, отражающими клинические особенности и тяжесть течения КМП (рис. 1; Приложение).

микроРНК также могут вовлекаться в разные с точки зрения патогенеза процессы, в том числе и с противоположными эффектами. Так, активация miR-499 связана как с патогенезом гипертрофии сердца посредством регуляции экспрессии генов саркомерных белков [88], так и с возможной кардиозащитной ролью через регуляцию проапоптотических генов, таких как *Pdcd4* и *Pasc2* [104]. Для miR-208a также показаны противоположные эффекты в отношении функционирования сердца при развитии ГКМП, посредством вовлеченности в различные молекулярные сети (см. обзор [42]). Так, miR-208a может регулировать экспрессию не только антигипертрофических, но и прогипертрофических генов (например, ген транскрипционного фактора *Gata4*, необходимый для развития гипертрофии сердца, ингибируется miR-208a) [51].

Экспрессионные профили нкРНК могут модифицироваться наличием сопутствующей патологии (и ее стадией) у обследованных индивидов. miR-208b рассматривают в качестве сывороточного маркера фибрилляции предсердий [105], ее уровень также повышен в миокарде у пациентов с данной патологией [69]. При этом фибрилляция предсердий может быть начальной стадией проявления кардиомиопатий (в том числе и у носите-

лей патогенных/вероятно патогенных вариантов в генах КМП) [106], а фенотип аритмогенной КМП может встречаться при других генетически обусловленных кардиомиопатиях [107].

По сравнению с контролем наблюдали более высокие уровни экспрессии KCNQ1OT1 в сыворотке крови у пациентов с инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST [108], у больных ишемической болезнью сердца [109], а МНРТ — в мононуклеарных клетках периферической крови у пациентов с гипертонической болезнью [95]. В то же время для МНРТ получены противоречивые данные об изменении ее уровня даже при одном и том же патологическом фенотипе. Так, в одном исследовании показано, что у пациентов с хронической сердечной недостаточностью уровень lncРНК МНРТ был снижен в сыворотке крови, причем пациенты с низким уровнем данной lncРНК имели более неблагоприятный прогноз по выживаемости [110], в другой работе при этой же патологии зарегистрирован более высокий ее уровень в плазме крови, который положительно коррелировал с некоторыми кардиальными биомаркерами (аспаратаминотрансферазой и лактатдегидрогеназой) [111]. J. Zhang с соавт. [112] показано, что lncРНК МНРТ обладает защитным эффектом для кардиомиоцитов, а концентрация МНРТ в плазме может служить диагностическим биомаркером для инфаркта миокарда (ИМ), тогда как другая группа исследователей [113] отмечала, что МНРТ способствовала фиброзу миокарда после ИМ через взаимодействие с miR-3185. Уровень МНРТ при патологии может различаться в зависимости от стадии болезни [114].

На основании анализа дифференциально экспрессирующихся lncРНК, микроРНК, а также мРНК в миокарде при сердечной недостаточности была сформирована сеть ceРНК, состоящая из 58 узловых мРНК, 5 микроРНК, 82 lncРНК, причем KCNQ1OT1 была среди трех наиболее значимых lncРНК [115]. Таким образом, одна и та же регуляторная нкРНК может быть вовлечена в формирование различных сетей с участием ceРНК, что может быть связано с дифференцированным ответом экспрессии микроРНК и lncРНК на эндогенные и экзогенные стимулы.

ВОВЛЕЧЕННОСТЬ нкРНК В МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В КАРДИОМИОЦИТАХ И МИОКАРДЕ В КОНТЕКСТЕ СРЕДОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

Известно, что, с одной стороны, развитие КМП может быть спровоцировано воздействием каких-то внешних (стресс, прием лекарственных препаратов) или внутренних (беременность, гипергликемия, гипертиреозидизм) факторов, с другой, — та-

кие же факторы могут влиять на изменение паттерна экспрессии нкРНК. При этом средовые факторы по-разному влияют на изменение уровня экспрессии нкРНК, которые вовлекаются в разнообразные патофизиологические процессы (в том числе и как сеРНК) и соответственно различаются по эффектам на функцию сердца и сосудов с точки зрения вред/польза. Так, уровень miR-1, miR-133a, miR-499 чувствителен к таким факторам как глюкоза, активные формы кислорода, фенантрен, ишемическое прекондиционирование и др., что может сказываться на патофизиологических процессах, значимых для развития КМП (табл. 2).

Интересно, что измененный уровень некоторых микроРНК в образцах левого желудочка сердца не восстанавливался после нормализации уровня глюкозы в крови: в частности, сохранялся повышенный уровень miR-342-3p, -490-3p и пониженный — miR-133a и miR-1 (miR-133a участвует в процессах аутофагии и гипертрофии, miR-1 — в развитии гипертрофии) [67]. В сыворотке крови крыс маркером кардиотоксичности, обусловленной лекарствами, является уровень miR-208 [131], а блокатор β -адренорецепторов карведилол приводит к увеличению экспрессии miR-1 в сыворотке крови, что оказывает кардиопротективный эффект у пациентов с сердечной недостаточностью [119].

При этом, с одной стороны, уровень регуляторных нкРНК зависит от других эпигенетических маркеров, а с другой, — они сами вовлекаются в эпигенетические процессы на разных уровнях. Например, в культуре H9C2 кардиомиоцитов крысы снижение уровня miR-133a при воздействии фенантреном достигается за счет увеличения метилирования CpG сайтов в промоторе гена *Mir133a* [80]. Уровень экспрессии miR-133a-1 при развитии кардиомиопатии контролируется гистондеацетилазами: показано, что HDAC1 и HDAC2 связываются с энхансерными областями гена *Mir-133a-1*, и на модельных объектах путем их блокировки удалось нормализовать уровень данной микроРНК и снизить неблагоприятные эффекты развития КМП (снижалась экспрессия фактора роста соединительной ткани, уменьшался фиброз миокарда и диаметр левого предсердия, приводя к улучшению диастолической функции сердца) [78].

miR-208 и miR-499 совместно с miR-1 и miR-133 влияют на уровень гистоновых метилтрансфераз и деметилаз, регулирующих триметилирование H3K27 (H3K27me3 — эпигенетическую модификацию, значимую для регуляции репрессии транскрипции), что приводит к изменению глобального уровня H3K27me3 (включая промоторные области кардиальных факторов транскрип-

ции) и снижению их экспрессии в фибробластах сердца [132].

Уровень микроРНК может регулироваться lncРНК. На мышинной модели гипертрофии сердца показано, что lncРНК ROR способствует гипертрофии сердца посредством взаимодействия с miR-133 [133]. Высокий потенциал связывания с miR-133 показан для circALMS1_6, и это взаимодействие определяет процессы ремоделирования сердца [21]. Эффект miR-499-5p на развитие патологического фенотипа при диабетической КМП (диастолическая дисфункция, гипертрофия сердца) зависит от lncРНК TUG1, которая напрямую взаимодействует с данной микроРНК, участвуя в развитии гипертрофии сердца [90]. Нокдаун TUG1 ослаблял гипертрофию сердца, индуцированную диабетической КМП, и диастолическую дисфункцию за счет увеличения уровня miR-499-5p [90].

В ряде исследований для микроРНК и lncРНК установлена вовлеченность в формирование различных типов тройной сети “lncРНК—микроРНК—мРНК” (и более сложных), значимых для развития патологических процессов в сердечно-сосудистой системе (см. табл. 2). Например, на фибробластах сердца показано, что при воздействии глюкозы в результате увеличения уровня Kcnqlot1 формирование оси Kcnqlot1/miR-214-3p/Caspase-1/TGF- β 1/Smad1/Smad2 способствует активации пироптоза и прогрессированию диабетической КМП [123].

В сложные эпигенетические взаимосвязи вовлечена lncРНК MHRT. Данная lncРНК защищает от патологической гипертрофической кардиомиопатии несколькими путями [9, 134, 135]. Так, Mhrt может ингибировать гипертрофию миокарда, индуцированную транскрипционным фактором миокардин (Myocd), посредством его ацетилирования с помощью HDAC5, а миокардин способен напрямую активировать транскрипцию *Mhrt* посредством связывания с CaG-боксом, т.е. Mhrt и миокардин образуют петлю регуляции в процессе гипертрофии сердца [134]. Возможны и иные пути участия Mhrt в возникновении и развитии гипертрофии миокарда, например путь Mhrt/KLF4/миокардин: Mhrt способствует экспрессии KLF4 посредством прямого связывания с miR-145a-5p или ингибирования фосфорилирования транскрипционного фактора KLF4 путем образования с ним комплекса для предотвращения связывания данного транскрипционного фактора с белками ERK, тем самым происходит ингибирование экспрессии миокардина и развитие гипертрофии миокарда [135].

Таблица 2. Вовлеченность нкРНК в молекулярно-генетические процессы в кардиомиоцитах и миокарде модельных животных или человека в контексте средовых воздействий

Фактор	Объект	Изменение экспрессии	Включенность в регуляторную сеть	Эффект	Источник
Химические вещества					
Сероводород	Кардиомиоциты новорожденных крыс	↓ miR-1	miR-1/Hdac4	Защита от апоптоза	[116]
Активные формы кислорода	Кардиомиоциты мыши	↑ miR-133a-3p	cisNCX1/miR-133a-3p/Cdip1	Способствует апоптозу	[117]
Фенантрин	Миокард, клетки H9C2 крыс	↓ miR-133a	miR-133a/CdC42, RhoA	Способствует гипертрофии кардиомиоцитов	[80]
Триоксид мышьяка	Кардиомиоциты, миокард мыши	↓ Kcnq1ot1	—	Внезапная сердечная смерть	[118]
Лекарственные препараты					
Карведилол, блокатор β-адренорецепторов	Сыворотка пациентов с СН	↑ miR-1	—	Кардиопротекция	[119]
Тикагелор	Сосуды аорты, пациенты с ИБС	↑ KCNQ1OT1	—	Защитный эффект сосудов аорты	[109]
Доксорубин	Кардиомиоциты AC16 из желудочков новорожденных крыс	↑ модификации m6A Kcnq1ot1	Mettl14/Kcnq1ot1(+Igf2bp1)/miR-7-5p/Mettl14*	Регуляция ферментоза кардиомиоцитов	[120]
	Клетки миокарда мышей, ткани миокарда мышей с СН	↑ Kcnq1ot1	Kcnq1ot1/Fus	Уменьшение фиброза миокарда, ингибирование апоптоза кардиомиоцитов у мышей с СН	[121]
Метаболиты					
Стимуляция TNF-α и IL-1β	Изолированные кардиомиоциты новорожденных крыс	↑ miR-133a	—	Влияет на количество воспалительных клеток в миокарде и на восстановление функции ЛЖ	[79]
Глюкоза	Кардиомиоциты, миокард мыши с СД	↓ miR-499-5p	Tug1/miR-499-5p	Развитие гипертрофии	[90]
	Кардиомиоциты, миокард мыши с СД	↑ Kcnq1ot1	Kcnq1ot1/miR-181a-5p/Pdcd4	Усиление воспаления миокарда и апоптоза кардиомиоцитов	[92]

Таблица 2. Продолжение

Фактор	Объект	Изменение экспрессии	Включенность в регуляторную сеть	Эффект	Источник
Глюкоза	Кардиомиоциты мышцы с СД2 (модель)	При ↑ Kcnqlot1	Kcnqlot1/miR-378a/mt-ATP6/ATP	Положительное влияние на функциональность АТФ-синтазы в сердце при СД2	[122]
	Фибробласты сердца	↑ Kcnqlot1	Kcnqlot1/miR-214-3p/Casprase-1/TGF-β1/Smad1/Smad2	Прогрессирование диабетической КМП, активация пироптоза	[123]
Ангиотензин II	Миокард мышцы	↑ Kcnqlot1	Kcnqlot1/miR-384/Casna1c	Фибрилляция предсердий	[124]
	Гипертрофические кардиомиоциты мышцы	Kcnqlot1	Kcnqlot1/miR-30e-5p/Adam9	Благоприятствует гипертрофии сердца	[97]
Пищевые вещества					
Диетическое льняное масло	Миокард крыс	↑ miR-133a	miR-133a/Col1α1	Кардиопротекция	[125]
6-Гингерол	Кардиомиоциты	↓ KCNQ1OT1	KCNQ1OT1/miR-340-5p/PI3K/AKT	Защита кардиомиоцитов от повреждения при гипоксии	[126]
Патологические состояния, заболевания					
Ишемическое пост-кондиционирование	Миокард пациентов, перенесших двойную замену клапанов	↓ miR-1	miR-1/BCL2	Ослабление апоптоза	[127]
Гипоксия	Кардиомиоциты мышцы, модель острого инфаркта миокарда	↑ Kcnqlot1	Kcnqlot1/miR-466k/miR-466i-5p/Tead1	Повреждение кардиомиоцитов в процессе острого инфаркта миокарда	[128]
Сепсис	Миокард крысы с сепсисом	↓ Kcnqlot1	Kcnqlot1/miR-192-5p/Xiap	Апоптоз кардиомиоцитов	[41]
Прекодиционирование гипертрофии миокарда, вызванное физической нагрузкой	Миокард мышцы	↑ Mhrt779	Mhrt779/Brg1/Hdac2/p-Akt/p-GSK3β	Антигипертрофический эффект	[129]
Гипертиреоз	ЛЖ крыс	↑ в 5 раз Mhrt	–	Повышение соотношения Mhrt6/Mhrt7	[130]
Патологический стресс	Миокард мышцы	↓ Mhrt	–	Развитие кардиомиопатии	[39]

Примечание. * Двойная регуляторная петля. СН – сердечная недостаточность; ИБС – ишемическая болезнь сердца. СД – сахарный диабет; СД2 – сахарный диабет, тип 2; ЛЖ – левый желудочек.

Кроме того, *Mhrt* также может противодействовать функции фактора ремоделирования хроматина *Brg1* путем связывания с его хеликазным доменом, что не позволяет *Brg1* распознавать свои мишени в геномной ДНК (такие как *Myh6*, *Myh7* и др.), предотвращая aberrантную реактивацию генов в сердце плода во время стресса [39, 45]. *Mhrt779* (наиболее распространенная форма *Mhrt* в желудочках сердца взрослых мышей) может связывать SWI/SNF-ассоциированный матричный актин-зависимый регулятор хроматина *Brg1*, чтобы ингибировать активацию гистоновой деацетилазы 2 (путь *Mhrt779/Brg1/Hdac2/p-Akt/p-GSK3β*) [129]. Предварительное кондиционирование гипертрофии физической нагрузкой повышает экспрессию днРНК *Mhrt779* за счет увеличения 3-метилирования гистона 3 на промоторе *a4 Mhrt779* [129]. В то же время при патологическом стрессе вследствие активации репрессорного комплекса хроматина *Brg1*—*Hdac*—*Parp* регистрировали ингибирование транскрипции *Mhrt* в сердце, и это снижение способствовало развитию КМП (восстановление *Mhrt* до дострессового уровня защищало сердце от гипертрофии и сердечной недостаточности) [39].

При этом в условиях стресса гормон трийодтиронин (Т3) активирует промотор *Mhrt* в двух чувствительных к гормонам щитовидной железы элементах, расположенных в критической области, которая необходима как для активации *Mhrt*, так и для *Brg1*-зависимой репрессии *Mhrt* (что происходит только в условиях гетерохроматизации ДНК) [130]. Т3 также способен предотвращать избыточную экспрессию *Brg1*, наблюдаемую в условиях после ишемии/реперфузии миокарда, посредством пути, который может повлечь за собой Т3-опосредованное повышение экспрессии *miR-208a* [130]. Избыточная экспрессия *Mir208a* приводит к резкому подавлению транскрипта фактора ремоделирования хроматина *Brg1*, что сопровождается более чем двукратным увеличением уровня экспрессии длинной нкРНК *Mhrt* и почти пятикратным увеличением отношения *Myh6/Myh7* [130]. Авторы процитированного исследования заключили, что реципрокное ингибирование *Mhrt*-*Brg1* представляет собой цепь отрицательной обратной связи, критически важную для поддержания функционирования сердца.

KCNQ1OT1 также чувствительна к средовым воздействиям. Токсичность для сердца препарата против острого промиелоцитарного лейкоза триоксида мышьяка (вызывает внезапную сердечную смерть в результате синдрома удлиненного интервала QT) связана с подавлением лнРНК *Kcnqlot1* [118]. В то же время тикагрелор (препарат, используемый для профилактики атеротромботи-

ческих осложнений у пациентов с острым коронарным синдромом) увеличивает экспрессию лнРНК *KCNQ1OT1*, что активизирует процессы, предотвращающие повреждение окисленными липопротеинами низкой плотности (ox-LDL) в гладкомышечных клетках сосудов аорты [109].

KCNQ1OT1, выступая в качестве сеРНК, вовлекается в многочисленные метаболические пути с разнонаправленными эффектами, в том числе и патогенетически значимые для функционирования сердечно-сосудистой системы. Так, на основании анализа дифференциально экспрессирующихся в моноцитах генов показана высокая степень связности *KCNQ1OT1* с микроРНК при ИБС (*miR-186-5p*, *miR-29c-3p*, *miR-493-5p*, *miR-30b-5p*, *miR-326*, *miR-543*, *miR-376a-3p*, *miR-103a-3p*) [136] и при сердечной недостаточности (*miR-17-5p*, *miR-20b-5p*, *miR-107*, *miR-125a-5p* и *miR-140-5p*) [115]. Уровень *miR-186-5p* повышался в кардиомиоцитах при неишемической ДКМП, вызванной длительным употреблением этанола (алкогольной КМП), и при обработке этанолом кардиомиоцитов, при этом снижался уровень ингибитора апоптоза XIAP, что способствовало апоптозу кардиомиоцитов [137]. Уровень *miR-29c* снижался в миокарде при ДКМП [81] и в крови при структурных и функциональных аномалиях сердца среди женщин-носительниц мутаций в гене дистрофина (*DMD*) [138]. При этом как одна и та же лнРНК может вовлекаться в регуляцию разных микроРНК, так и для одной и той же микроРНК в качестве конкурирующих могут выступать разные лнРНК. Например, для *miR-376-3p* в качестве сеРНК может выступать не только *KCNQ1OT1*, но и *LINC01703* и *MEG3* [115].

Kcnqlot1, выступая в качестве губки для *miR-466k* и *miR-466i-5p*, обуславливает увеличение экспрессии транскрипционного фактора *Tead1*, тем самым вызывая повреждение кардиомиоцитов в процессе острого инфаркта миокарда [128], связываясь с *miR-204-5p* усугубляет ишемическо-реперфузионное повреждение миокарда у мышей за счет увеличения экспрессии *LGALS3* [139], а с *miR-223-3p* — вовлекается в патогенез мерцательной аритмии [140], ослабляет гипертрофию сердца за счет модуляции оси *miR-2054/AKT3* [141]. *In vivo* и *in vitro* показано, что ось *KCNQ1OT1/miR-26a-5p/ATG12* регулирует аутофагию и апоптоз кардиомиоцитов [142].

Уровень *Kcnqlot1* в митохондриях кардиомиоцитов значительно снижен по сравнению с контролем у пациентов с сахарным диабетом (СД) 2-го типа и 25-недельных мышей *Db/Db* (в данном случае была задействована метаболическая ось *Kcnqlot1/miR-378a/mt-ATP6/ATP*) [122]. В то же

время повышенный уровень экспрессии KCNQ1OT1 регистрировали в кардиомиоцитах человека, обработанных высокими концентрациями глюкозы, что приводило к увеличению уровня PDCD4 и снижению — miR-181a-5p (т.е. задействована ось KCNQ1OT1/miR-181a-5p/PDCD4) [92]. На мышинных моделях СД показано, что сайленсинг Kcnq1ot1 ингибировал апоптоз кардиомиоцитов у мышей с диабетической КМП, индуцированной стрептозотоцином, путем регуляции метаболической цепочки с участием miR-181a-5p/PDCD4 [92]. Однако 6-гингерол (растительное вещество, которое содержится преимущественно в корневище имбиря) препятствовал экспрессии KCNQ1OT1, и кардиомиоциты были защищены от повреждения, вызванного гипоксией через пути KCNQ1OT1/miR-340-5p/PI3K/АКТ [126].

Длинная нкРНК KCNQ1OT1, выступающая в качестве губки miR-7-5p (имеет мишени на мРНК генов *METTL14* и *TFRC*), подвергается модификации m6A при участии N6-метилтрансферазного комплекса (включает METTL14), при этом ассоциация KCNQ1OT1 с РНК-связывающим белком IGF2BP1 повышает стабильность данной лнРНК и надежность ингибирования активности miR-7-5p [120]. Эта ось — METTL14/KCNQ1OT1/miR-7-5p/METTL14/TFRC, имеющая петлю положительной обратной связи, значима для регуляции ферроптоза в кардиомиоцитах желудочков новорожденных крыс [120].

Вовлеченность в эпигенетические процессы установлена и для других лнРНК. Так, уровни РНК-деметилазы FTO и Mhrt снижены в миокарде мышей с сердечной недостаточностью, при этом наблюдалось увеличение общего уровня метиладенозина N6 (m6A) и уровня m6A Mhrt, тогда как сверхэкспрессия FTO приводит к повышению уровня Mhrt и снижению m6A Mhrt в обработанных гипоксией/реоксигенацией клетках миокарда [143].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, эффекты регуляторных нкРНК, в том числе тех, чьи гены перекрываются по локализации с генами КМП, проявляются в результате сложных взаимодействий как между собой [21, 43, 47, 130], так и с другими РНК (лнРНК, микроРНК, циркуРНК, мРНК) и белковыми молекулами, в том числе и задействованными в эпигенетической регуляции на уровне модификации гистонов и ремоделирования хроматина [21, 47, 53, 90, 130, 132]. Нарушения в таких взаимодействиях могут определять функциональное состояние сердца и риск развития патологий. При этом экспрессия регуляторных нкРНК — это динамический про-

цесс, специфичный для клеток и тканей на разных стадиях онтогенеза, чувствительный к эндогенным преобразованиям организма и экзогенным воздействиям.

микроРНК и лнРНК, рассмотренными в настоящей статье, не исчерпывается перечень тех регуляторных элементов, гены которых перекрываются с генами КМП. В связи с этим следует ожидать расширение спектра как генов нкРНК и кодируемых ими регуляторных элементов, так и патофизиологических процессов, участие в которых может быть значимым для формирования риска развития и определения характера течения КМП. Для моногенных форм КМП данные нкРНК могут выступать в качестве факторов, способствующих пенетрантности патогенных вариантов. Кроме того, в патологические процессы могут быть вовлечены также нкРНК, локализованные в других регионах генома.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования № 122020300041-7.

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

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhou H., Wang B., Yang Y.X. et al. Long noncoding RNAs in pathological cardiac remodeling: A review of the update literature // Biomed. Res. Int. 2019. V. 2019. P. 7159592. <https://doi.org/10.1155/2019/7159592>
2. Mushtaq I., Ishtiaq A., Ali T. et al. An overview of non-coding RNAs and cardiovascular system // Adv. Exp. Med. Biol. 2020. V. 1229. P. 3–45. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1671-9_1
3. Tang Y., Bao J., Hu J. et al. Circular RNA in cardiovascular disease: expression, mechanisms and clinical prospects // J. Cell. Mol. Med. 2021. V. 25. № 4. P. 1817–1824. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16203>
4. Qin X., Huang L., Chen S. et al. Multi-factor regulatory network and different clusters in hypertrophic obstructive cardiomyopathy // BMC Med. Genomics. 2021. V. 14. № 1. P. 199. <https://doi.org/10.1186/s12920-021-01036-4>
5. Chiti E., Paolo M.D., Turillazzi E., Rocchi A. MicroRNAs in hypertrophic, arrhythmogenic and dilated cardiomyopathy // Diagnostics (Basel). 2021. V. 11. № 9.

- P. 1720.
<https://doi.org/10.3390/diagnostics11091720>
6. Cao M., Luo H., Li D. et al. Research advances on circulating long noncoding RNAs as biomarkers of cardiovascular diseases // *Int. J. Cardiol.* 2022. V. 353. P. 109–117.
<https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2022.01.070>
7. Кучер А.Н., Назаренко М.С. Эпигенетика кардиомиопатий: модификации гистонов и метилирование ДНК // *Генетика.* 2023. Т. 59. № 3. С. 266–182.
8. Li M., Duan L., Li Y., Liu B. Long noncoding RNA/circular noncoding RNA-miRNA-mRNA axes in cardiovascular diseases // *Life Sci.* 2019. V. 233. P. 116440.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.04.066>
9. Shahzadi S.K., Naidoo N., Alsheikh-Ali A. et al. Reconfirming the role of long-noncoding RNAs in hypertrophic cardiomyopathy: A descriptive review // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 17. P. 9378.
<https://doi.org/10.3390/ijms22179378>
10. Meder B., Haas J., Sedaghat-Hamedani F. et al. Epigenome-wide association study identifies cardiac gene patterning and a novel class of biomarkers for heart failure // *Circulation.* 2017. V. 136. № 16. P. 1528–1544.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.027355>
11. Cheedipudi S.M., Matkovich S.J., Coarfa C. et al. Genomic reorganization of lamin-associated domains in cardiac myocytes is associated with differential gene expression and DNA methylation in human dilated cardiomyopathy // *Circ. Res.* 2019. V. 124. № 8. P. 1198–1213.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.314177>
12. Liu C.F., Abnoui A., Bazeley P. et al. Global analysis of histone modifications and long-range chromatin interactions revealed the differential cisome changes and novel transcriptional players in human dilated cardiomyopathy // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2020. V. 145. P. 30–42.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2020.06.001>
13. Pei J., Schuldt M., Nagyova E. et al. Multi-omics integration identifies key upstream regulators of pathomechanisms in hypertrophic cardiomyopathy due to truncating *MYBPC3* mutations // *Clin. Epigenetics.* 2021. V. 13. № 1. P. 61.
<https://doi.org/10.1186/s13148-021-01043-3>
14. Simple ClinVar [Electronic resource]. URL: <https://simple-clinvar.broadinstitute.org/> Accessed 03.2022.
15. Pérez-Palma E., Gramm M., Nürnberg P. et al. Simple ClinVar: An interactive web server to explore and retrieve gene and disease variants aggregated in ClinVar database // *Nucl. Acids Res.* 2019. V. 47. № W1. P. W99–W105.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkz411>
16. ClinGen [Electronic resource]. URL: <https://clinical-genome.org/> Accessed 05.2022.
17. miRBase: the microRNA database. [Electronic resource]. URL: <https://www.mirbase.org/> Accessed 04.2022.
18. RNAcentral: The non-coding RNA sequence database. [Electronic resource]. URL: <https://rnacentral.org/> Accessed 04.2022.
19. GeneCards®: The Human Gene Database [Electronic resource]. URL: <https://www.genecards.org/> Accessed 04.2022.
20. Khan M.A., Reckman Y.J., Aufiero S. et al. RBM20 Regulates circular RNA production from the titin gene // *Circ. Res.* 2016. V. 119. № 9. P. 996–1003.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309568>
21. Dong K., He X., Su H. et al. Genomic analysis of circular RNAs in heart // *BMC Med. Genomics.* 2020. V. 13. № 1. P. 167.
<https://doi.org/10.1186/s12920-020-00817-7>
22. Gao J., Collyer J., Wang M. et al. Genetic dissection of hypertrophic cardiomyopathy with myocardial RNA-Seq // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 9. P. 3040.
<https://doi.org/10.3390/ijms21093040>
23. Hombach S., Kretz M. Non-coding RNAs: classification, biology and functioning // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016. V. 937. P. 3–17.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-42059-2_1
24. Stavast C.J., Erkeland S.J. The non-canonical aspects of MicroRNAs: Many roads to gene regulation // *Cells.* 2019. V. 8. № 11. P. 1465.
<https://doi.org/10.3390/cells8111465>
25. Rao P.K., Toyama Y., Chiang H.R. et al. Loss of cardiac microRNA-mediated regulation leads to dilated cardiomyopathy and heart failure // *Circ. Res.* 2009. V. 105. № 6. P. 585–594.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.200451>
26. Yang L. Splicing noncoding RNAs from the inside out // *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* 2015. V. 6. № 6. P. 651–660.
<https://doi.org/10.1002/wrna.1307>
27. Jarroux J., Morillon A., Pinskaya M. History, discovery, and classification of lncRNAs // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2017. V. 1008. P. 1–46.
https://doi.org/10.1007/978-981-10-5203-3_1
28. Luo S., Lu J.Y., Liu L. et al. Divergent lncRNAs regulate gene expression and lineage differentiation in pluripotent cells // *Cell Stem Cell.* 2016. V. 18. № 5. P. 637–652.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.01.024>
29. Barrett S.P., Salzman J. Circular RNAs: analysis, expression and potential functions // *Development.* 2016. V. 143. № 11. P. 1838–1847.
<https://doi.org/10.1242/dev.128074>
30. Liang D., Tatomer D.C., Luo Z. et al. The output of protein-coding genes shifts to circular RNAs when the pre-mRNA processing machinery is limiting // *Mol. Cell.* 2017. V. 68. № 5. P. 940–954.e3.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.10.034>
31. Vo J.N., Cieslik M., Zhang Y. et al. The landscape of circular RNA in cancer // *Cell.* 2019. V. 176. № 4. P. 869–881.e13.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.021>

32. *Kazmierczyk M., Kasprowicz M.K., Kasprzyk M.E., Wrzesinski J.* Human long noncoding RNA interactome: detection, characterization and function // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 3. P. 1027. <https://doi.org/10.3390/ijms21031027>
33. *Yuan Y., Wang J., Chen Q. et al.* Long non-coding RNA cytoskeleton regulator RNA (CYTOR) modulates pathological cardiac hypertrophy through miR-155-mediated IKKi signaling // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2019. V. 1865. № 6. P. 1421–1427. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.02.014>
34. *Guo Q., Wang J., Sun R. et al.* Comprehensive construction of a circular RNA-associated competing endogenous RNA network identified novel circular RNAs in hypertrophic cardiomyopathy by integrated analysis // *Front. Genet.* 2020. V. 11. P. 764. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00764>
35. *Guo Q., Wang J., Sun R. et al.* Identification of circulating hub long noncoding RNAs associated with hypertrophic cardiomyopathy using weighted correlation network analysis // *Mol. Med. Rep.* 2020. V. 22. № 6. P. 4637–4644. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11566>
36. *Guo W., Schafer S., Greaser M.L. et al.* *RBM20*, a gene for hereditary cardiomyopathy, regulates titin splicing // *Nat. Med.* 2012. V. 18. № 5. P. 766–773. <https://doi.org/10.1038/nm.2693>
37. *Gi W.T., Haas J., Sedaghat-Hamedani F. et al.* Epigenetic regulation of alternative mRNA splicing in dilated cardiomyopathy // *J. Clin. Med.* 2020. V. 9. № 5. P. 1499. <https://doi.org/10.3390/jcm9051499>
38. *Oliveira-Carvalho V., Carvalho V.O., Bocchi E.A.* The emerging role of miR-208a in the heart // *DNA Cell. Biol.* 2013. V. 32. № 1. P. 8–12. <https://doi.org/10.1089/dna.2012.1787.0>
39. *Han P., Li W., Lin C.H. et al.* A long noncoding RNA protects the heart from pathological hypertrophy // *Nature.* 2014. V. 514. № 7520. P. 102–106. <https://doi.org/10.1038/nature13596>
40. *Zhao X., Wang Y., Sun X.* The functions of microRNA-208 in the heart // *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2020. V. 160. P. 108004. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2020.108004>
41. *Sun F., Yuan W., Wu H. et al.* LncRNA KCNQ1OT1 attenuates sepsis-induced myocardial injury via regulating miR-192-5p/XIAP axis // *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 2020. V. 245. № 7. P. 620–630. <https://doi.org/10.1177/1535370220908041>
42. *Huang X.H., Li J.L., Li X.Y. et al.* miR-208a in cardiac hypertrophy and remodeling // *Front. Cardiovasc. Med.* 2021. V. 8. P. 773314. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.773314>
43. *van Rooij E., Quiat D., Johnson B.A. et al.* A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance // *Dev. Cell.* 2009. V. 17. № 5. P. 662–673. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.10.013>
44. *Korostowski L., Sedlak N., Engel N.* The *Kcnq1ot1* long non-coding RNA affects chromatin conformation and expression of *Kcnq1*, but does not regulate its imprinting in the developing heart // *PLoS Genet.* 2012. V. 8. № 9. P. e1002956. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002956>
45. *Wu C., Arora P.* Long noncoding *Mhrt* RNA: Molecular crowbar unravel insights into heart failure treatment // *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2015. V. 8. № 1. P. 213–215. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.115.001019>
46. *Kakimoto Y., Tanaka M., Kamiguchi H. et al.* MicroRNA deep sequencing reveals chamber-specific miR-208 family expression patterns in the human heart // *Int. J. Cardiol.* 2016. V. 211. P. 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.02.145>
47. *Harikrishnan K.N., Okabe J., Mathiyalagan P. et al.* Sex-based *Mhrt* methylation chromatinizes *MeCP2* in the heart // *iScience.* 2019. V. 17. P. 288–301. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.06.031>
48. *Iannolo G., Sciuto M.R., Cuscino N. et al.* miRNA expression analysis in the human heart: Undifferentiated progenitors vs. bioptic tissues-implications for proliferation and ageing // *J. Cell. Mol. Med.* 2021. V. 25. № 18. P. 8687–8700. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16824>
49. *Kim S.K., Bennett R., Ingles J. et al.* Arrhythmia in cardiomyopathy: sex and gender differences // *Curr. Heart Fail. Rep.* 2021. V. 18. № 5. P. 274–283. <https://doi.org/10.1007/s11897-021-00531-0>
50. *Chistiakov D.A., Orekhov A.N., Bobryshev Y.V.* Cardiac-specific miRNA in cardiogenesis, heart function, and cardiac pathology (with focus on myocardial infarction) // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2016. V. 94. P. 107–121. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.03.015>
51. *Callis T.E., Pandya K., Seok H.Y. et al.* MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice // *J. Clin. Invest.* 2009. V. 119. № 9. P. 2772–2786. <https://doi.org/10.1172/JCI36154>
52. *Hupfeld J., Ernst M., Knyrim M. et al.* miR-208b reduces the expression of *Kcnj5* in a cardiomyocyte cell line // *Biomedicines.* 2021. V. 9. № 7. P. 719. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9070719>
53. *Mathiyalagan P., Okabe J., Chang L. et al.* The primary microRNA-208b interacts with Polycomb-group protein, Ezh2, to regulate gene expression in the heart // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. № 2. P. 790–803. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt896>
54. *Zhou Q., Schötterl S., Backes D. et al.* Inhibition of miR-208b improves cardiac function in titin-based dilated cardiomyopathy // *Int. J. Cardiol.* 2017. V. 230. P. 634–641. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.12.171>

55. *Tsuji M., Kawasaki T., Matsuda T. et al.* Sexual dimorphisms of mRNA and miRNA in human/murine heart disease // *PLoS One*. 2017. V. 12. № 7. P. e0177988. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177988>
56. *Gioffré S., Ricci V., Vavassori C. et al.* Plasmatic and chamber-specific modulation of cardiac microRNAs in an acute model of DOX-induced cardiotoxicity // *Biomed. Pharmacother.* 2019. V. 110. P. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.042>
57. *Schultz B.M., Gallicio G.A., Cesaroni M. et al.* Enhancers compete with a long non-coding RNA for regulation of the Kcnq1 domain // *Nucl. Acids Res.* 2015. V. 43. № 2. P. 745–759. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1324>
58. *Terranova R., Yokobayashi S., Stadler M.B. et al.* Polycomb group proteins Ezh2 and Rnf2 direct genomic contraction and imprinted repression in early mouse embryos // *Dev. Cell*. 2008. V. 15. № 5. P. 668–679. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.08.015>
59. *Halliday B.P., Gulati A., Ali A. et al.* Sex- and age-based differences in the natural history and outcome of dilated cardiomyopathy // *Eur. J. Heart Fail.* 2018. V. 20. № 10. P. 1392–1400. <https://doi.org/10.1002/ehfj.1216>
60. *Pelliccia F., Limongelli G., Autore C. et al.* Sex-related differences in cardiomyopathies // *Int. J. Cardiol.* 2019. V. 286. P. 239–243. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2018.10.091>
61. *De Bellis A., De Angelis G., Fabris E. et al.* Gender-related differences in heart failure: beyond the “one-size-fits-all” paradigm // *Heart Fail. Rev.* 2020. V. 25. № 2. P. 245–255. <https://doi.org/10.1007/s10741-019-09824-y>
62. *Palacín M., Reguero J.R., Martín M. et al.* Profile of microRNAs differentially produced in hearts from patients with hypertrophic cardiomyopathy and sarcomeric mutations // *Clin. Chem.* 2011. V. 57. № 11. P. 1614–1616. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2011.168005>
63. *Bagnall R.D., Tsoutsman T., Shephard R.E. et al.* Global microRNA profiling of the mouse ventricles during development of severe hypertrophic cardiomyopathy and heart failure // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 9. P. e44744. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044744>
64. *Ferreira L.R., Frade A.F., Santos R.H. et al.* MicroRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-208a and miR-208b are dysregulated in Chronic Chagas disease Cardiomyopathy // *Int. J. Cardiol.* 2014. V. 175. № 3. P. 409–417. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.05.019>
65. *Jaguszewski M., Osipova J., Ghadri J.R. et al.* A signature of circulating microRNAs differentiates takotsubo cardiomyopathy from acute myocardial infarction // *Eur. Heart J.* 2014. V. 35. № 15. P. 999–1006. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz392>
66. *Roncarati R., Viviani Anselmi C., Losi M.A. et al.* Circulating miR-29a, among other up-regulated microRNAs, is the only biomarker for both hypertrophy and fibrosis in patients with hypertrophic cardiomyopathy // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2014. V. 63. № 9. P. 920–927. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.09.041>
67. *Costantino S., Paneni F., Lüscher T.F., Cosentino F.* MicroRNA profiling unveils hyperglycaemic memory in the diabetic heart // *Eur. Heart J.* 2016. V. 37. № 6. P. 572–576. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv599>
68. *de Gonzalo-Calvo D., van der Meer R.W., Rijzewijk L.J. et al.* Serum microRNA-1 and microRNA-133a levels reflect myocardial steatosis in uncomplicated type 2 diabetes // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 47. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00070-6>
69. *Li M., Chen X., Chen L. et al.* MiR-1-3p that correlates with left ventricular function of HCM can serve as a potential target and differentiate HCM from DCM // *J. Transl. Med.* 2018. V. 16. № 1. P. 161. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1534-3>
70. *Scolari F.L., Faganello L.S., Garbin H.I. et al.* A systematic review of microRNAs in patients with hypertrophic cardiomyopathy // *Int. J. Cardiol.* 2021. V. 327. P. 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2020.11.004>
71. *Calderon-Dominguez M., Belmonte T., Quezada-Feijoo M. et al.* Plasma microRNA expression profile for reduced ejection fraction in dilated cardiomyopathy // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. № 1. P. 7517. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87086-1>
72. *Hailu F.T., Karimpour-Fard A., Toni L.S. et al.* Integrated analysis of miRNA-mRNA interaction in pediatric dilated cardiomyopathy // *Pediatr. Res.* 2021. May 19. <https://doi.org/10.1038/s41390-021-01548-w>
73. *Khudiakov A.A., Panshin D.D., Fomicheva Y.V. et al.* Different expressions of pericardial fluid MicroRNAs in patients with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy and ischemic heart disease undergoing ventricular tachycardia ablation // *Front. Cardiovasc. Med.* 2021. V. 8. P. 647812. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.647812>
74. *Liu Y., Li Y., Li J. et al.* Inhibiting miR-1 attenuates pulmonary arterial hypertension in rats // *Mol. Med. Rep.* 2021. V. 23(4): 283. <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.11922>
75. *Thottakara T., Lund N., Krämer E. et al.* A novel miRNA screen identifies miRNA-4454 as a candidate biomarker for ventricular fibrosis in patients with hypertrophic cardiomyopathy // *Biomolecules*. 2021. V. 11. № 11. P. 1718. <https://doi.org/10.3390/biom11111718>
76. *Chen S., Puthanveetil P., Feng B. et al.* Cardiac miR-133a overexpression prevents early cardiac fibrosis in diabetes // *J. Cell. Mol. Med.* 2014. V. 18. № 3. P. 415–421. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12218>
77. *Fang L., Ellims A.H., Moore X.L. et al.* Circulating microRNAs as biomarkers for diffuse myocardial fibrosis in patients with hypertrophic cardiomyopathy // *J. Transl. Med.* 2015. V. 13. P. 314. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0672-0>

78. Renaud L., Harris L.G., Mani S.K. et al. HDACs regulate miR-133a expression in pressure overload-induced cardiac fibrosis // *Circ. Heart. Fail.* 2015. V. 8. № 6. P. 1094–1104.
<https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.114.001781>
79. Besler C., Urban D., Watzka S. et al. Endomyocardial miR-133a levels correlate with myocardial inflammation, improved left ventricular function, and clinical outcome in patients with inflammatory cardiomyopathy // *Eur. J. Heart Fail.* 2016. V. 18. № 12. P. 1442–1451.
<https://doi.org/10.1002/ehf.579>
80. Huang L., Xi Z., Wang C. et al. Phenanthrene exposure induces cardiac hypertrophy via reducing miR-133a expression by DNA methylation // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 20105.
<https://doi.org/10.1038/srep20105>
81. Wang Y., Li M., Xu L. et al. Expression of Bcl-2 and microRNAs in cardiac tissues of patients with dilated cardiomyopathy // *Mol. Med. Rep.* 2017. V. 15. № 1. P. 359–365.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5977>
82. Rubiś P., Totoń-Żurańska J., Wiśniowska-Śmiątek S. et al. The relationship between myocardial fibrosis and myocardial microRNAs in dilated cardiomyopathy: A link between miR-133a and cardiovascular events // *J. Cell. Mol. Med.* 2018. V. 22. № 4. P. 2514–2517.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.13535>
83. Dziewięcka E., Totoń-Żurańska J., Wołkow P. et al. Relations between circulating and myocardial fibrosis-linked microRNAs with left ventricular reverse remodeling in dilated cardiomyopathy // *Adv. Clin. Exp. Med.* 2020. V. 29. № 3. P. 285–293.
<https://doi.org/10.17219/acem/115088>
84. Bueno Marinas M., Celeghin R., Cason M. et al. A microRNA expression profile as non-invasive biomarker in a large arrhythmogenic cardiomyopathy cohort // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 4. P. 1536.
<https://doi.org/10.3390/ijms21041536>
85. Satoh M., Minami Y., Takahashi Y. et al. Expression of microRNA-208 is associated with adverse clinical outcomes in human dilated cardiomyopathy // *J. Card. Fail.* 2010. V. 16. № 5. P. 404–410.
<https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2010.01.002>
86. Xue J., Zhou D., Poulsen O. et al. Exploring miRNA-mRNA regulatory network in cardiac pathology in Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 transgenic mice // *Physiol. Genomics.* 2018. V. 50. № 10. P. 846–861.
<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00048.2018>
87. Qiang L., Hong L., Ningfu W. et al. Expression of miR-126 and miR-508-5p in endothelial progenitor cells is associated with the prognosis of chronic heart failure patients // *Int. J. Cardiol.* 2013. V. 168. № 3. P. 2082–2088.
<https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.01.160>
88. Matkovich S.J., Hu Y., Eschenbacher W.H. et al. Direct and indirect involvement of microRNA-499 in clinical and experimental cardiomyopathy // *Circ. Res.* 2012. V. 111. № 5. P. 521–531.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.265736>
89. Calore M., Lorenzon A., Vitiello L. et al. A novel murine model for arrhythmogenic cardiomyopathy points to a pathogenic role of Wnt signalling and miRNA dysregulation // *Cardiovasc. Res.* 2019. V. 115. № 4. P. 739–751.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvy253>
90. Zhao L., Li W., Zhao H. Inhibition of long non-coding RNA TUG1 protects against diabetic cardiomyopathy induced diastolic dysfunction by regulating miR-499-5p // *Am. J. Transl. Res.* 2020. V. 12. № 3. P. 718–730.
91. Yang F., Qin Y., Wang Y. et al. LncRNA KCNQ1OT1 mediates pyroptosis in diabetic cardiomyopathy // *Cell. Physiol. Biochem.* 2018. V. 50. № 4. P. 1230–1244.
<https://doi.org/10.1159/000494576>
92. Zhao S.F., Ye Y.X., Xu J.D. et al. Long non-coding RNA KCNQ1OT1 increases the expression of PDCD4 by targeting miR-181a-5p, contributing to cardiomyocyte apoptosis in diabetic cardiomyopathy // *Acta Diabetol.* 2021. V. 58. № 9. P. 1251–1267.
<https://doi.org/10.1007/s00592-021-01713-x>
93. Duisters R.F., Tijssen A.J., Schroen B. et al. miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor: Implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling // *Circ. Res.* 2009. V. 104. № 2. P. 170–178.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.182535>
94. Gutmann C., Khamina K., Theofilatos K. et al. Association of cardiometabolic microRNAs with COVID-19 severity and mortality // *Cardiovasc. Res.* 2022. V. 118. № 2. P. 461–474.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvab338>
95. Kontarakis J.E., Marketou M.E., Kochiadakis G.E. et al. The long non-coding RNAs MHRT, FENDRR and CARMEN, their expression levels in peripheral blood mononuclear cells in patients with essential hypertension and their relation to heart hypertrophy // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2018. V. 45. № 11. P. 1213–1217.
<https://doi.org/10.1111/1440-1681.12997>
96. van Rooij E., Sutherland L.B., Qi X. et al. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA // *Science.* 2007. V. 316. № 5824. P. 575–579.
<https://doi.org/10.1126/science.1139089>
97. Wang W., Wu C., Ren L. et al. MiR-30e-5p is sponged by Kcnq1ot1 and represses Angiotensin II-induced hypertrophic phenotypes in cardiomyocytes by targeting ADAM9 // *Exp. Cell. Res.* 2020. V. 394. № 2. P. 112140.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.112140>
98. Jia Y., Duan Y., Liu T. et al. LncRNA TTN-AS1 promotes migration, invasion, and epithelial mesenchymal transition of lung adenocarcinoma via sponging miR-142-5p to regulate CDK5 // *Cell Death Dis.* 2019. V. 10. № 8. P. 573.
<https://doi.org/10.1038/s41419-019-1811-y>

99. *Chen P., Wang R., Yue Q., Hao M.* Long non-coding RNA TTN-AS1 promotes cell growth and metastasis in cervical cancer via miR-573/E2F3 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018. V. 503. № 4. P. 2956–2962.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.08.077>
100. *Dong M.M., Peng S.J., Yuan Y.N., Luo H.P.* LncRNA TTN-AS1 contributes to gastric cancer progression by acting as a competing endogenous RNA of miR-376b-3p // *Neoplasma.* 2019. V. 66. № 4. P. 564–575.
https://doi.org/10.4149/neo_2018_180927N721
101. *Tian C., Yang Y., Ke Y. et al.* Integrative analyses of genes associated with right ventricular cardiomyopathy induced by tricuspid regurgitation // *Front. Genet.* 2021. V. 12. P. 708275.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2021.708275>
102. *Jiao M., You H.Z., Yang X.Y. et al.* Circulating microRNA signature for the diagnosis of childhood dilated cardiomyopathy // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 724.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-19138-4>
103. *Toro R., Blasco-Turrión S., Morales-Ponce F.J. et al.* Plasma microRNAs as biomarkers for Lamin A/C-related dilated cardiomyopathy // *J. Mol. Med. (Berl.)* 2018. V. 96. № 8. P. 845–856.
<https://doi.org/10.1007/s00109-018-1666-1>
104. *Wang J., Jia Z., Zhang C. et al.* miR-499 protects cardiomyocytes from H₂O₂-induced apoptosis via its effects on *Pcd4* and *Pacs2* // *RNA Biol.* 2014. V. 11. № 4. P. 339–350.
<https://doi.org/10.4161/rna.28300>
105. *Paul A., Pai P.G., Ariyannur P.S., Joy R.A.* Diagnostic accuracy of MicroRNA 208b level with respect to different types of atrial fibrillation // *Indian Heart J.* 2021. V. 73. № 4. P. 506–510.
<https://doi.org/10.1016/j.ihj.2021.06.018>
106. *Yoneda Z.T., Anderson K.C., Quintana J.A. et al.* Early-onset atrial fibrillation and the prevalence of rare variants in cardiomyopathy and arrhythmia genes // *JAMA Cardiol.* 2021. V. 6. № 12. P. 1371–1379.
<https://doi.org/10.1001/jamacardio.2021.3370>
107. *Cipriani A., Perazzolo Marra M., Bariani R. et al.* Differential diagnosis of arrhythmogenic cardiomyopathy: Phenocopies versus disease variants // *Minerva Med.* 2021. V. 112. № 2. P. 269–280.
<https://doi.org/10.23736/S0026-4806.20.06782-8>
108. *Li M., Wang Y.F., Yang X.C. et al.* Circulating long noncoding RNA LIPCAR acts as a novel biomarker in patients with ST-segment elevation myocardial infarction // *Med. Sci. Monit.* 2018. V. 24. P. 5064–5070.
<https://doi.org/10.12659/MSM.909348>
109. *Wang Y., Jiao J., Wang D. et al.* Effects of ticagrelor on proliferation, apoptosis, and inflammatory factors of human aortic vascular smooth muscle cells through lncRNA KCNQ1OT1 // *Am. J. Transl. Res.* 2021. V. 13. № 12. P. 13462–13470.
110. *Zhang L., Wu Y.J., Zhang S.L.* Circulating lncRNA MHRT predicts survival of patients with chronic heart failure // *J. Geriatr. Cardiol.* 2019. V. 16. № 11. P. 818–821.
<https://doi.org/10.11909/j.issn.1671-5411.2019.11.006>
111. *Xuan L., Sun L., Zhang Y. et al.* Circulating long non-coding RNAs NRON and MHRT as novel predictive biomarkers of heart failure // *J. Cell. Mol. Med.* 2017. V. 21. № 9. P. 1803–1814.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.13101>
112. *Zhang J., Gao C., Meng M., Tang H.* Long noncoding RNA MHRT protects cardiomyocytes against H₂O₂-induced apoptosis // *Biomol. Ther. (Seoul).* 2016. V. 24. № 1. P. 19–24.
<https://doi.org/10.4062/biomolther.2015.066>
113. *Lang M., Ou D., Liu Z. et al.* LncRNA MHRT promotes cardiac fibrosis via miR-3185 pathway following myocardial infarction // *Int. Heart. J.* 2021. V. 62. № 4. P. 891–899.
<https://doi.org/10.1536/ihj.20-298>
114. *Zhou Q., Chen J., Wu D. et al.* Differential expression of long non-coding RNAs SRA, HCG22 and MHRT in children with Kawasaki disease // *Exp. Ther. Med.* 2021. V. 22. № 3. P. 1022.
<https://doi.org/10.3892/etm.2021.10454>
115. *Ma X., Zhang Q., Zhu H. et al.* Establishment and analysis of the lncRNA-miRNA-mRNA network based on competitive endogenous RNA identifies functional genes in heart failure // *Math. Biosci. Eng.* 2021. V. 18. № 4. P. 4011–4026.
<https://doi.org/10.3934/mbe.2021201>
116. *Kang B., Li W., Xi W. et al.* Hydrogen sulfide protects cardiomyocytes against apoptosis in ischemia/reperfusion through MiR-1-regulated histone deacetylase 4 pathway // *Cell. Physiol. Biochem.* 2017. V. 41. № 1. P. 10–21.
<https://doi.org/10.1159/000455816>
117. *Li M., Ding W., Tariq M.A. et al.* A circular transcript of ncx1 gene mediates ischemic myocardial injury by targeting miR-133a-3p // *Theranostics.* 2018. V. 8. № 21. P. 5855–5869.
<https://doi.org/10.7150/thno.27285>
118. *Jiang Y., Du W., Chu Q. et al.* Downregulation of long non-coding RNA Kcnqlot1: An important mechanism of arsenic trioxide-induced long QT syndrome // *Cell. Physiol. Biochem.* 2018. V. 45. № 1. P. 192–202.
<https://doi.org/10.1159/000486357>
119. *Shirazi-Tehrani E., Firouzabadi N., Tamaddon G. et al.* Carvedilol alters circulating MiR-1 and MiR-214 in heart failure // *Pharmgenomics. Pers. Med.* 2020. V. 13. P. 375–383.
<https://doi.org/10.2147/PGPM.S263740>
120. *Zhuang S., Ma Y., Zeng Y. et al.* METTL14 promotes doxorubicin-induced cardiomyocyte ferroptosis by regulating the KCNQ1OT1-miR-7-5p-TFRC axis // *Cell. Biol. Toxicol.* 2021. Oct 14.
<https://doi.org/10.1007/s10565-021-09660-7>
121. *Lai L., Xu Y., Kang L. et al.* LncRNA KCNQ1OT1 contributes to cardiomyocyte apoptosis by targeting

- FUS in heart failure // *Exp. Mol. Pathol.* 2020. V. 115. P. 104480.
<https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2020.104480>
122. *Durr A.J., Hathaway Q.A., Kunovac A. et al.* Manipulation of the MiR-378a/mt-ATP6 regulatory axis rescues ATP synthase in the diabetic heart and offers a novel role for LncRNA Kcnq1ot1 // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2022. V. 322. № 2. P. C482–C495.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00446.2021>
 123. *Yang F., Qin Y., Lv J. et al.* Silencing long non-coding RNA Kcnq1ot1 alleviates pyroptosis and fibrosis in diabetic cardiomyopathy // *Cell. Death. Dis.* 2018. V. 9. № 10. P. 1000.
<https://doi.org/10.1038/s41419-018-1029-4>
 124. *Shen C., Kong B., Liu Y. et al.* YY1-induced upregulation of lncRNA KCNQ1OT1 regulates angiotensin II-induced atrial fibrillation by modulating miR-384b/CACNA1C axis // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018. V. 505. № 1. P. 134–140.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.09.064>
 125. *Parikh M., Kura B., O'Hara K.A. et al.* Cardioprotective effects of dietary flaxseed post-infarction are associated with changes in MicroRNA expression // *Biomolecules.* 2020. V. 10. № 9. P. 1297.
<https://doi.org/10.3390/biom10091297>
 126. *Pan F., Xu X., Zhan Z., Xu Q.* 6-Gingerol protects cardiomyocytes against hypoxia-induced injury by regulating the KCNQ1OT1/miR-340-5p/PI3K/AKT pathway // *Panminerva Med.* 2021. V. 63. № 4. P. 482–490.
<https://doi.org/10.23736/S0031-0808.20.03956-7>
 127. *Gao Y., Huang R., Chen R. et al.* Ischemic postconditioning altered microRNAs in human valve replacement // *J. Surg. Res.* 2016. V. 200. № 1. P. 28–35.
<https://doi.org/10.1016/j.jss.2015.07.010>
 128. *Liao B., Dong S., Xu Z. et al.* LncRNA Kcnq1ot1 renders cardiomyocytes apoptosis in acute myocardial infarction model by up-regulating Tead1 // *Life Sci.* 2020. V. 256. P. 117811.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117811>
 129. *Lin H., Zhu Y., Zheng C. et al.* Antihypertrophic Memory after regression of exercise-induced physiological myocardial hypertrophy is mediated by the long non-coding RNA Mhrt779 // *Circulation.* 2021. V. 143. № 23. P. 2277–2292.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047000>
 130. *Forini F., Nicolini G., Kusmic C. et al.* T3 Critically affects the Mhrt/Brg1 axis to regulate the cardiac MHC switch: Role of an epigenetic cross-talk // *Cells.* 2020. V. 9. № 10. P. 2155.
<https://doi.org/10.3390/cells9102155>
 131. *Nishimura Y., Kondo C., Morikawa Y. et al.* Plasma miR-208 as a useful biomarker for drug-induced cardiotoxicity in rats // *J. Appl. Toxicol.* 2015. V. 35. № 2. P. 173–180.
<https://doi.org/10.1002/jat.3044>
 132. *Dal-Pra S., Hodgkinson C.P., Mirotso M. et al.* Demethylation of H3K27 is essential for the induction of direct cardiac reprogramming by miR combo // *Circ. Res.* 2017. V. 120. № 9. P. 1403–1413.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308741>
 133. *Jiang F., Zhou X., Huang J.* Long non-coding RNA-ROR mediates the reprogramming in cardiac hypertrophy // *PLoS One.* 2016. V. 11. № 4. P. e0152767.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152767>
 134. *Luo Y., Xu Y., Liang C. et al.* The mechanism of myocardial hypertrophy regulated by the interaction between mhrt and myocardin // *Cell. Signal.* 2018. V. 43. P. 11–20.
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.11.007>
 135. *Xu Y., Luo Y., Liang C., Zhang T.* LncRNA-Mhrt regulates cardiac hypertrophy by modulating the miR-145a-5p/KLF4/myocardin axis // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2020. V. 139. P. 47–61.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2019.12.013>
 136. *Bian W., Jiang X.X., Wang Z. et al.* Comprehensive analysis of the ceRNA network in coronary artery disease // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. № 1. P. 24279.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-03688-9>
 137. *Liu Y., Yu B.* MicroRNA 186 5p is expressed highly in ethanol induced cardiomyocytes and regulates apoptosis via the target gene XIAP // *Mol. Med. Rep.* 2019. V. 19. № 4. P. 3179–3189.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2019.9953>
 138. *Florian A., Patrascu A., Tremmel R. et al.* Identification of cardiomyopathy-associated circulating miRNA biomarkers in muscular dystrophy female carriers using a complementary cardiac imaging and plasma profiling approach // *Front. Physiol.* 2018. V. 9. P. 1770.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01770>
 139. *Rong J., Pan H., He J. et al.* Long non-coding RNA KCNQ1OT1/microRNA-204-5p/LGALS3 axis regulates myocardial ischemia/reperfusion injury in mice // *Cell Signal.* 2020. V. 66. P. 109441.
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109441>
 140. *Dai W., Chao X., Jiang Z., Zhong G.* lncRNA KCNQ1OT1 may function as a competitive endogenous RNA in atrial fibrillation by sponging miR-223-3p // *Mol. Med. Rep.* 2021. V. 24. № 6. P. 870.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2021.12510>
 141. *Chen Y., Zhang Z., Zhu D. et al.* Knockdown of *KCNQ1OT1* attenuates cardiac hypertrophy through modulation of the miR-2054/AKT3 axis // *J. Thorac. Dis.* 2020. V. 12. № 9. P. 4771–4780.
<https://doi.org/10.21037/jtd-20-203>
 142. *Li J., Tong Y., Zhou Y. et al.* LncRNA KCNQ1OT1 as a miR-26a-5p sponge regulates ATG12-mediated cardiomyocyte autophagy and aggravates myocardial infarction // *Int. J. Cardiol.* 2021. V. 338. P. 14–23.
<https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2021.05.053>
 143. *Shen W., Li H., Su H. et al.* FTO overexpression inhibits apoptosis of hypoxia/reoxygenation-treated myocardial cells by regulating m6A modification of Mhrt // *Mol. Cell. Biochem.* 2021. V. 476. № 5. P. 2171–2179.
<https://doi.org/10.1007/s11010-021-04069-6>

Regulatory Potential of Non-Coding RNAs Colocalized with Cardiomyopathy-Related Genes

A. N. Kucher^a and M. S. Nazarenko^{a, *}

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

^{*}*e-mail: maria.nazarenko@medgenetics.ru*

Non-coding RNAs (ncRNAs) play an important role in the regulation of the activity of genes essential for the development and function of the cardiovascular system. Intragenic ncRNAs have been shown to be coordinately regulated and/or expressed with their host genes, including ncRNAs resided within cardiomyopathy (CMP)-related genes. This review summarizes the results of CMP-related intragenic ncRNA studies in the function of the healthy heart and in the development of different forms of CMPs. CMP-related intragenic ncRNAs such as miRNAs (miR-1, miR-133a, miR-208a, miR-208b, miR-324, miR-490, miR-499a) and long ncRNAs (MHRT, TTN-AS1 and KCNQ1OT1) are actively involved in research. It has been established that the level of these of ncRNAs in myocardium is characterized by developmental-stage-specific dynamics, gender-specific and chamber-specific patterns. These ncRNAs exhibit differential expression in myocardium/serum of humans and model animals under the influence of exogenous and endogenous factors. The expression levels of these ncRNAs in the myocardium/serum is associated with clinical features during the development and progression of CMPs. The change in the level of ncRNAs preceding clinical manifestation of CMPs have been reported. The possibility to arrest the development of CMPs and even the restoration of the normal phenotype by controlling the levels of these regulatory molecules indicate their involvement in the pathogenesis of the disease. miRNAs and long ncRNAs, whose genes resided within CMP-related genes, are involved in various metabolic processes that are important for the heart function, including their involvement in epigenetic processes.

Keywords: cardiomyopathy (CMP), miRNAs, long non-coding RNAs, CMP-related intragenic ncRNAs.

ГЕНЕТИЧЕСКИ ИЗОЛИРОВАННАЯ ПОПУЛЯЦИЯ ДРОЖЖЕЙ *Saccharomyces bayanus* В НОВОЙ ЗЕЛАНДИИ И АВСТРАЛИИ

© 2023 г. А. Н. Боровкова^{1, 2}, Г. И. Наумов¹, А. В. Шнырева², Е. С. Наумова¹, *

¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Курчатовский комплекс генетических исследований (ГосНИИгенетика), Москва, 123098 Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

*e-mail: lena_naumova@yahoo.com

Поступила в редакцию 11.07.2022 г.

После доработки 05.09.2022 г.

Принята к публикации 20.09.2022 г.

С помощью методов молекулярной и классической генетики изучено генетическое родство дрожжей комплекса *Saccharomyces bayanus* и обнаружена дивергентная популяция этих дрожжей в Новой Зеландии и Австралии. Комплекс *S. bayanus* включает четыре генетические популяции: *S. bayanus* var. *bayanus*, *S. bayanus* var. *uvarum*, *S. eubayanus* и новозеландская. Штаммы новозеландской популяции существенно отличаются по нуклеотидным последовательностям ядерных (*FSY1*, *HIS3*, *MET2*) и митохондриальных (*FUN14*, *COX2*) генов и образуют полустерильные гибриды с остальными популяциями: 6.2–23.3%. Между *S. bayanus* var. *bayanus*, *S. bayanus* var. *uvarum*, *S. eubayanus* и новозеландской популяцией нет полной межвидовой постзиготической изоляции: все гибриды имели регулярное мейотическое расщепление контрольных ауксотрофных маркеров. Согласно полученным результатам указанные генетические популяции относятся к одному биологическому виду, обладая дивергенцией геномов на уровне таксономических разновидностей.

Ключевые слова: комплекс *Saccharomyces bayanus*, *S. bayanus* var. *bayanus*, *S. bayanus* var. *uvarum*, *S. eubayanus*, новозеландская популяция, гибридологический и филогенетический анализы, молекулярное каритипирование.

DOI: 10.31857/S0016675823040021, **EDN:** ATSSFD

Генофонд культурных дрожжей-сахаромицетов представлен видами *S. cerevisiae*, *S. bayanus* (син. *S. uvarum*) и их гибридом *S. pastorianus* (син. *S. carlsbergensis*) [1, 2]. Помимо двух указанных род *Saccharomyces* включает еще шесть видов: *S. arboricola*, *S. cariocanus*, *S. jurei*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* и *S. paradoxus* [2–6]. Благодаря общей системе типов спаривания восемь биологических видов рода *Saccharomyces* могут скрещиваться во всех комбинациях, но за счет постзиготической изоляции образующиеся гибриды стерильны и имеют нежизнеспособные аскоспоры. Естественные межвидовые гибриды *S. cerevisiae* × *S. bayanus*, *S. cerevisiae* × *S. kudriavzevii* и *S. cerevisiae* × *S. bayanus* × *S. kudriavzevii* обнаружены среди коммерческих винных, пекарских и пивных дрожжей, используемых во Франции, Испании, Австрии, Швейцарии и Австралии [7–11].

Растущий интерес к изучению дрожжей *S. bayanus* связан не только с его возможной ролью в качестве одного из родительских геномов пивных дрожжей низового брожения *S. pastorianus*, но и с его значением как нового генофонда культурных дрожжей *Saccharomyces*. С помощью различных молекулярных методов была показана гетерогенность вида

S. bayanus, включающего две группы штаммов, которые различаются по рибосомным последовательностям (ITS1 и IGS2) и молекулярным каритипам: “*bayanus*” и “*uvarum*” [7, 12, 13]. Гибридологическим анализом установлена частичная генетическая изоляция указанных групп: их гибриды полустерильны (15–34% выживаемости аскоспор), имея регулярную мейотическую сегрегацию ауксотрофных контрольных маркеров [7, 14]. В то же время штаммы обеих групп образуют стерильные гибриды с дрожжами *S. cerevisiae*. На основании генетических и молекулярных данных были предложены две разновидности вида *S. bayanus*: var. *bayanus* и var. *uvarum*, принятые в современных монографиях по систематике дрожжей [2, 7, 14].

Специфической экологической нишей *S. bayanus* var. *uvarum* является виноделие и виноградарство при пониженных температурах: эти дрожжи ассоциированы с производством белых, сладких и игристых вин, а также сидра [15–23]. Природные изоляты *S. bayanus* var. *uvarum* обнаружены в Испании, Словакии, Венгрии, Португалии, на Дальнем Востоке России, в США, Аргентине, Чили, Австралии и Новой Зеландии [1, 20, 24]. Дрожжи

S. bayanus var. *bayanus* представлены в основном штаммами, загрязняющими пивоварение, включая типовую культуру CBS 380 [7, 13]. Некоторые авторы возводят указанные разновидности в ранг отдельных видов: *S. bayanus* и *S. uvarum* [25–27]. В отличие от *S. bayanus* var. *uvarum* дрожжи *S. bayanus* var. *bayanus* обладают субтеломерными последовательностями *S. cerevisiae* [7, 28]. На этом основании было высказано предположение о гибридной природе этих дрожжей и было предложено закрыть вид *S. bayanus* как “неправильный” (not proper) и восстановить не содержащий чужеродных последовательностей вид *S. uvarum* как таксономически “чистый” [26, 28, 29]. В качестве типовой культуры был выбран штамм CBS 7001 (МСУС 623), у которого определена полная нуклеотидная последовательность генома [30]. С помощью ПДРФ-анализа 48 генов и частичного секвенирования 16 из них Rainieri et al. [27] подтвердили гомогенность дрожжей *S. bayanus* var. *uvarum*. Среди дрожжей *S. bayanus* var. *bayanus* авторами также была обнаружена “чистая” линия: штамм NBRC 1948, выделенный из испорченного бочкового пива в Европе. Этот штамм был предложен в качестве новой типовой культуры вида *S. bayanus*.

Более детальное молекулярное изучение выявило мозаичность генома штамма NBRC 1948, содержащего последовательности *uvarum* и второго вида *S. bayanus*-типа, условно названного авторами *S. lagerae*, а также интрогессивные субтеломерные фрагменты *S. cerevisiae* [31]. Родственные дрожжи *S. eubayanus* были описаны на изолятах из Аргентины, а позже обнаружены в Китае, США, Канаде, Австралии и Новой Зеландии [24, 32–35]. В Европе геном *S. eubayanus* обнаружен только у гибридных дрожжей *S. pastorianus* [36, 37]. Гибридологическим анализом показано, что гибриды *S. bayanus* var. *bayanus* × *S. eubayanus* обладают пониженной выживаемостью аскоспор: 55–62% [38]. Гибриды *S. bayanus* var. *uvarum* × *S. eubayanus* практически стерильны: 11% выживаемости аскоспор. В то же время во всех скрещиваниях наблюдалась рекомбинация родительских маркеров. Полногеномное секвенирование нескольких штаммов *S. eubayanus* обнаружило их большое сходство с холодоустойчивым родителем пивных дрожжей *S. pastorianus* [36, 37, 39]. Выявлено большое сходство генома штамма NBRC 1948 с типовой культурой *S. eubayanus* CBS 12357 и холодоустойчивым геномом пивного коммерческого штамма Weihenstephan 34/70 [13, 24]. Еще больше усложнило понимание таксономического статуса дрожжей *S. bayanus* обнаружение новозеландской популяции, штаммы которой по ряду молекулярных маркеров отличаются от *S. bayanus* var. *bayanus*, *S. bayanus* var. *uvarum* и *S. eubayanus* [20].

Цель исследования — изучение генетического родства дрожжей комплекса *S. bayanus*, включая

географически изолированную популяцию из Новой Зеландии и Австралии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Среды и штаммы

Изучаемые штаммы дрожжей *S. bayanus* и их происхождение приведены в табл. 1. Дрожжи культивировали при 28°C на полной агаризованной среде YPD следующего состава (г/л): глюкоза — 20, пептон — 20, дрожжевой экстракт — 10, агар — 20.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Полимеразную цепную реакцию осуществляли на ДНК-амплификаторе “Bio-Rad” (США). Дрожжевую ДНК выделяли согласно Lloke et al. [40]. Праймеры, использованные в работе, приведены в табл. 2. ПЦР проводили в 30 мкл буфера, содержащего 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mM каждого dNTP, 50 пмоль каждого праймера, 2.5 единицы Taq-полимеразы (Синтол, Россия) и 20–200 нг ДНК. Для амплификации генов *MET2*, *HIS3*, *FSY1* и *FUN14* использовали следующую программу: начальная денатурация ДНК при 94°C в течение 3 мин; затем 30 циклов в режиме: денатурация в режиме 94°C — 30 с, отжиг праймеров при 56°C — 30 с, синтез ДНК при 72°C — 60 с; конечная достройка при 72°C — 10 мин. Амплификацию межгенного спейсера *IGS2* проводили в следующем режиме: начальная денатурация ДНК при 94°C в течение 4 мин; затем 25 циклов: денатурация при 94°C — 60 с, отжиг праймеров при 48°C — 30 с, синтез ДНК при 72°C — 60 с; конечная достройка при 72°C — 10 мин. Митохондриальный ген *COX2* амплифицировали по следующей программе: начальная денатурация ДНК при 94°C в течение 5 мин; затем 45 циклов в режиме: денатурация при 94°C — 40 с, отжиг праймеров при 45°C — 35 с, синтез ДНК при 72°C — 35 с; конечная достройка при 72°C — 10 мин. Продукты амплификации подвергали электрофорезу в 1%-ном агарозном геле при 60–65 В в 0.5× TBE буфере (45 mM трис, 10 mM ЭДТА, 45 mM борная кислота, pH 8.0) в течение 1–1.5 ч. Гель окрашивали бромистым этидием, промывали в дистиллированной воде и фотографировали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе Vilber Lourmat (Франция). В качестве маркера молекулярных масс использовали 1kb DNA Ladder (Fermentas, Литва).

Определение нуклеотидных последовательностей и филогенетический анализ

Амплифицированные фрагменты элюировали из геля с помощью набора GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, США), согласно протоколу фирмы-изготовителя. Нуклеотидные последовательности генов определяли по двум цепям с по-

Таблица 1. Происхождение изученных штаммов *Saccharomyces*

Штамм	Источник и место выделения	Регистрационный номер в GenBank				
		MET2	HIS3	FSY1	FUN14	COX2
<i>S. cerevisiae</i>						
YNN295	Генетическая линия	—	—	—	—	—
S288C	Генетическая линия	NM_001183115	NM_001183621	—	NM_001178153	NC_001224
ВКМ Y—502	Виноград, Дальний Восток, Россия	—	—	—	—	—
<i>S. bayanus</i> var. <i>bayanus</i>						
CBS 380	Пиво	AJ627635.1	JF786624.1	GCA_013180675.1	GCA_013180675.1	AF442211
CBS 425	Яблочный сок, Швейцария	OP355544	JF786626	JF786693	JF786618	OP355555
CBS 424	Грушевый сок, Швейцария	FR774000	OP355535	OP355524	OP355516	OP355554
NBRC 1948	Испорченное пиво, Европа	JF786641.1	GCA_013180125.1	GCA_013180125.1	GCA_013180125.1	EF639726
CBS 378	Пиво, Европа	JF786659	OP355533	JF786695	JF786658	OP355553
<i>S. bayanus</i> var. <i>uvanum</i>						
CBS 395	Сок черной смородины <i>Ribes nigrum</i> , Нидерланды	AJ627638	OP355534	HE858456	KF892125	KX657742
CBS 7001	Ручейник <i>Mesophylax adopersus</i> , Испания	GCA_019953615.1	GCA_019953615.1	GCA_019953615.1	GCA_019953615.1	KF530350
ВКМ Y—1146	Виноград, Мичуринск, Россия	GCA_013180055.1	GCA_013180055.1	GCA_013180055.1	GCA_013180055.1	GCA_013180055.1
CBS 377	Грушевое вино, Германия	GCA_013265775.1	GCA_013265775.1	GCA_013265775.1	GCA_013265775.1	GCA_013265775.1
M488	Виноград, Молдавия	GCA_013180195.1	GCA_013180195.1	GCA_013180195.1	GCA_013180195.1	GCA_013180195.1
ВКМ Y—361	Токайское вино, Словакия	GCA_013180345.1	GCA_013180345.1	GCA_013180345.1	GCA_013180345.1	GCA_013180345.1
ВКМ Y—508	Токайское вино, Словакия	GCA_013180255.1	GCA_013180255.1	GCA_013180255.1	GCA_013180255.1	GCA_013180255.1
PJ52.95	Бродящая мезга, Сансер, Франция	GCA_013179965.1	GCA_013179965.1	GCA_013179965.1	GCA_013179965.1	GCA_013179965.1
148.01	Экссудат вяза <i>Ulmus rumila</i> , Благоевещенск, Россия	GCA_013265745.1	GCA_013265745.1	GCA_013265745.1	GCA_013265745.1	GCA_013265745.1
NCAIM Y.00676	Алкольный напиток, Венгрия	GCA_013180065.1	GCA_013180065.1	GCA_013180065.1	GCA_013180065.1	GCA_013180065.1
РУСС 7082	<i>Suytaria</i> sp. на <i>Nothofagus dombevi</i> , Патагония, Аргентина	OP355536	OP355525	OP355517	OP355509	OP355545
РУСС 7083	Кора <i>Nothofagus pumillo</i> , Патагония, Аргентина	OP355537	OP355526	OP355518	OP355510	OP355546
РУСС 6330	Плодовое тело <i>Suytaria hariotii</i> , Патагония, Аргентина	JF786645	JF786630	JF786699	JF786622	OP355552

Таблица 1. Продолжение

Штамм	Источник и место выделения	Регистрационный номер в GenBank				
		MET2	HIS3	FSYI	FUN14	COX2
UWO(PS) 99-808	Сокоотечение бука <i>Nothofagus</i> sp., Патагония, Аргентина	OP355543	OP355532	JF786703	—	OP355551
Новозеландская популяция						
РУСС 6864	<i>Cyttaria gunnii</i> на <i>Nothofagus menziesii</i> , Новая Зеландия	OP355538	OP355527	OP355519	OP355511	OP355547
РУСС 6865	Кора <i>Nothofagus cunninghamii</i> , Тасмания, Австралия	OP355539	OP355528	OP355520	OP355512	—
РУСС 6867	Кора <i>Nothofagus solandri</i> var. <i>solandri</i> , Новая Зеландия	OP355540	OP355529	OP355521	OP355513	OP355548
РУСС 6868	Кора <i>Nothofagus solandri</i> var. <i>solandri</i> , Новая Зеландия	OP355541	OP355530	OP355522	OP355514	OP355549
РУСС 6869	Кора <i>Nothofagus solandri</i> var. <i>solandri</i> , Новая Зеландия	OP355542	OP355531	OP355523	OP355515	OP355550
<i>S. eubayanus</i>						
CBS 12357	<i>Cyttaria harioiti</i> , Аргентина	GCA_003327605.1	GCA_003327605.1	GCA_003327605.1	GCA_003327605.1	CP030961
РУСС 7084	<i>Cyttaria harioiti</i> на <i>Nothofagus dombevi</i> , Аргентина	KF530488	KF530444	KF530380	KF530401	KF530338
РУСС 7085	Кора <i>Nothofagus antarctica</i> , Аргентина	KF530492	KF530448	KF530384	KF530405	KF530341
РУСС 7087	Почва под <i>Nothofagus pumilio</i> , Аргентина	KF530495	KF530451	KF530387	KF530408	—
РУСС 7088	Почва под <i>Nothofagus pumilio</i> , Аргентина	KF530496	KF530452	KF530388	KF530409	KF530345
РУСС 7089	Почва под <i>Nothofagus oblique</i> , Аргентина	KF530497	KF530453	KF530389	KF530410	KF530346
уНКС210	Кора <i>Fagus grandifolia</i> , Висконсин, США	KF530498	KF530454	KF530390	KF530411	KF530347
уНКС211	Кора <i>Fagus grandifolia</i> , Висконсин, США	KF530499	KF530455	KF530391	KF530412	KF530348
уНКС212	Кора <i>Acer saccharum</i> , Висконсин, США	KF530500	KF530456	KF530392	KF530413	KF530349

Примечание. ВКМ – Всероссийская коллекция микроорганизмов (Пушино, Россия); М – Коллекция микроорганизмов виноделия “Магарах” (КМВ “Магарах”), ФГБУН ВНИИВиВ “Магарах” РАН (Ялта, Россия); CBS – The Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (Утрехт, Нидерланды); NBRC/IFO – National Institute of Technology and Evaluation (Токио, Япония); NCAIM – National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms (Будапешт, Венгрия); РУСС – Portuguese Yeast Collection (Лиссабон, Португалия); UWO (PS) – Culture Collection of the Department of Biology, University of Western Ontario (Онтарио, Канада); PJS2.95 – штамм из коллекции Institut des Sciences De la Vigne et du Vin (ISVV) (Вильнав-д’Орнон, Франция). Остальные штаммы из коллекций лабораторий молекулярной генетики дрожжей “ГосНИИГенетика”, НИЦ “Курчатовский институт” (Москва, Россия). Соответствия некоторых номеров коллекций: РУСС 7082 = CRUB 1586; РУСС 7083 = CRUB 1778.

Таблица 2. Используемые в работе праймеры [12, 32]

Ген или район амплификации	Последовательность праймера (5'–3')	Размер амплифицированного фрагмента, пн
IGS2 рДНК	NTS2: AACGGTGCTTTCTGGTAG	1300
	ETS1: TGTCTTCAACTGCTTT	
FSY1	FSY11: GGATCYTCRACAAGCGTTTCTC	1247
	FSY12: AAGGCAAACAYGTAAAGCAAAG	
MET2	MET21: CGAAAACGCTCCAAGAGCTGG	415
	MET22: GACCACGATATGCACCAGGCAG	
HIS3	HIS31: ATGTCAGAGCAAAGGCCCTA	579
	HIS32: CATGAGAACACCCTTTGTGGA	
COX2	COX21: GGTATTTTAGAATTACATGA	564
	COX22: ATTTATTGTTTCRTTTAATCA	
FUN14	FUN14D: TATTAAGCTGGGAGTGCCCTT	429
	FUN14R: TTATTGGCGTTTAGGCTTGA	

мощью прямого секвенирования по методу Сенгера на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 (США). Поиск гомологии с известными нуклеотидными последовательностями проводили с помощью программы BLAST в базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Множественные выравнивания изученных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Филогенетические деревья строили методом объединения соседей (Neighbor-Joining) в программе MEGA7 [41].

ПДРФ-анализ ПЦР-амплифицированных IGS2-участков рДНК

Рестрикционный анализ осуществляли с помощью эндонуклеазы *AluI* (Fermentas) в течение 12 ч при 37°C. Разделение фрагментов рестрикции проводили в 2.5%-ном агарозном геле при 50–60 В в 0.5× TBE-буфере в течение 2.5–3 ч. Гель окрашивали бромистым этидием (0.5 мкг/мл) в течение 2–3 ч, затем промывали в дистиллированной воде и фотографировали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе Vilber Lourmat (Франция). В качестве маркера молекулярных масс использовали 100bp DNA Ladder (Fermentas).

Молекулярное кариотипирование и Саузерн-гибридизация

Выделение хромосомной ДНК проводили как описано ранее [15]. Для разделения хромосомной ДНК использовали аппарат CHEF-DR III (Bio-Rad, США). Образцы помещали в щели 1%-ного агарозного геля. Для разделения хромосомных полос использовали два режима кариотипирования: 1) 200 В, в течение 15 ч при времени переключения полей 60 с и 9 ч при времени переключения полей 90 с; 2) 200 В, в течение 24 ч при времени переключения полей 15–40 с. В качестве буфера использовали 0.5× TBE, охлажденный до 14°C. Штамм *Saccharomyces cerevisiae* YNN 295 (Bio-Rad), имеющий известный порядок и размеры хромосом, служил кариотипическим стандартом. После электрофореза гель окрашивали бромистым этидием в течение 2–3 ч, затем промывали в дистиллированной воде в течение 2 ч и фотографировали в УФ-свете. Использовали 1%-ную агарозу.

Хромосомную ДНК переносили на нитроцеллюлозную мембрану, используя аппарат Vacuum blotter (Bio-Rad). ДНК фиксировали на мембране путем отжига при 80°C в течение 2 ч. В качестве зонда использовали ПЦР-амплифицированный ген *ACT1* дрожжей *S. cerevisiae* S288C. Метку вводили нерадиоактивным методом с использованием dUTP, меченного диоксигенином (dig-II-dUTP) из набора DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche, Швейцария), согласно инструкции производителя. Гибридизацию и

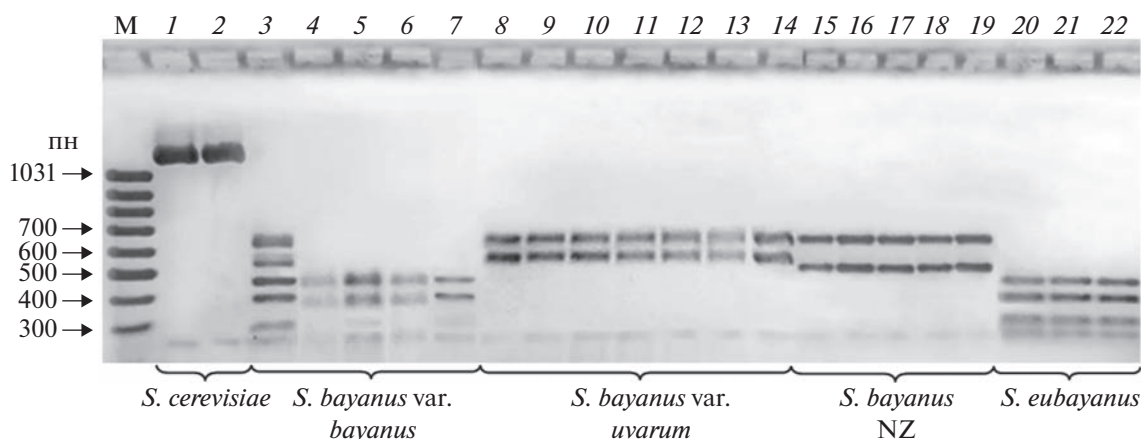


Рис. 1. ПДРФ-анализ амплифицированных фрагментов межгенного спейсера IGS2 дрожжей комплекса *Saccharomyces bayanus* с помощью эндонуклеазы *AluI*. *S. cerevisiae* (контроль): 1 – S288C, 2 – BKM Y–502; *S. bayanus* var. *bayanus*: 3 – CBS 380, 4 – CBS 378, 5 – CBS 424, 6 – CBS 425, 7 – NBRC 1948; *S. bayanus* var. *uvarum*: 8 – BKM Y–1146, 9 – M488, 10 – NCAIM Y.00677, 11 – PJS 2.95, 12 – 148.01, 13 – UWO(PS) 99-808, 14 – M300; Новозеландская (NZ) популяция дрожжей *S. bayanus*: 15 – PYCC 6864, 16 – PYCC 6865, 17 – PYCC 6867, 18 – PYCC 6868, 19 – PYCC 6869; *S. eubayanus*: 20 – CBS 12357, 21 – PYCC 7085, 22 – yHKS 210. М – маркер молекулярных масс. 100 bp DNA Ladder (Fermentas, Литва).

проявление гибридизационных полос также проводили по инструкции указанной фирмы.

Гибридологический анализ

Дрожжи скрещивали на полной агаризованной среде YPD; спорообразование индуцировали на ацетатной среде (г/л): CH_3COONa – 10, KCl – 5, агар – 20. Спонтанные ауксотрофные мутации *lys* и *ura* отбирали на селективных средах, содержащих соответственно DL-аминоадипиновую и 5'-фтороротовую кислоты [42, 43]. Гибридизацию проводили методом “спора на спору” с использованием микроманипулятора или массовым скрещиванием спор на полной среде с последующим отбором гибридов на минимальных селективных средах. Состав минимальной среды (г/л): дрожжевая азотная основа без аминокислот (фирмы “Difco”, США) – 6.7, глюкоза – 20, агар – 20. Аскоспоры изолировали с помощью микроманипулятора, предварительно разрушив оболочку асков ферментативным препаратом из желудка виноградных улиток *Helix pomatia*.

РЕЗУЛЬТАТЫ

С помощью различных молекулярных методов и гибридологического анализа мы изучили генетическое родство 33 штаммов комплекса *S. bayanus*. Штаммы выделены из ферментационных процессов и различных природных источников в разных регионах мира: Россия, Нидерланды, Швейцария, Испания, Германия, Франция, Словакия, Венгрия, Молдавия, Аргентина, США, Австралия и Новая Зеландия (табл. 1).

ПДРФ-анализ ПЦР-амплифицированных IGS2-участков рДНК

У изученных штаммов *S. bayanus* были проведены амплификация IGS2-участка рДНК и последующий ПДРФ-анализ с помощью рестриктазы *AluI*. На рис. 1 представлены ПДРФ-паттерны некоторых штаммов. С помощью этого молекулярного маркера можно четко дифференцировать виды *S. cerevisiae* и *S. bayanus*, а также внутривидовые популяции последнего (рис. 1, дорожки 1, 2 и 3–22 соответственно). По сходству *AluI*-профилей изученные штаммы *S. bayanus* разделились на четыре группы. Идентичные паттерны имели штаммы *S. bayanus* var. *bayanus* (CBS 378, CBS 424, CBS 425, NBRC 1948) и *S. eubayanus* (дорожки 4–7 и 20–22 соответственно). Вторую группу составили штаммы *S. bayanus* var. *uvarum*, имеющие три *AluI*-фрагмента размером 610, 520 и 170 пн (дорожки 8–14). В третью группу вошли пять штаммов *S. bayanus*, изолированных в Австралии (Тасмания) и Новой Зеландии (далее новозеландская популяция, NZ), у которых средний фрагмент был несколько меньшего размера: 500 пн (дорожки 15–19). Четвертая группа представлена типовой культурой *S. bayanus* var. *bayanus* CBS 380, в *AluI*-профиле которой объединены фрагменты, характерные для *S. bayanus* var. *bayanus* и *S. bayanus* var. *uvarum* (дорожка 3).

Мультигенный филогенетический анализ

Для установления филогенетического родства изученных штаммов мы провели сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей трех ядерных (*FSY1*, *HIS3*, *MET2*) и двух митохондриальных (*FUN14*, *COX2*) генов.

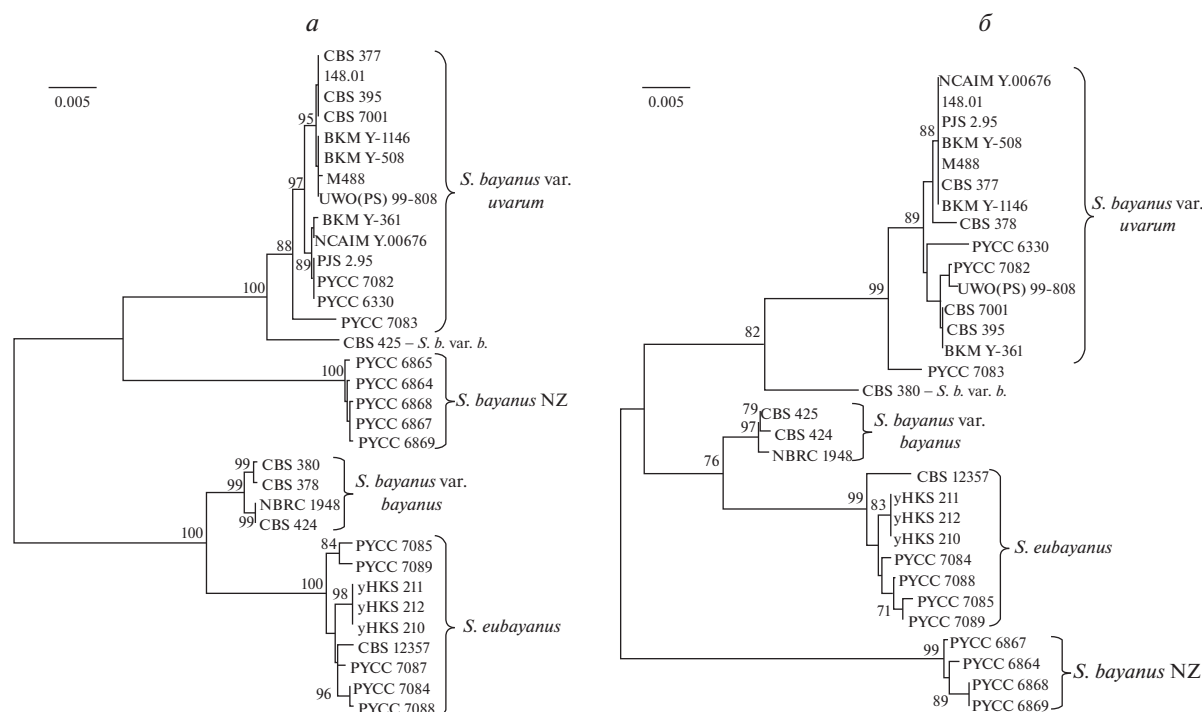


Рис. 2. Филогенетические деревья, построенные по нуклеотидным последовательностям ядерных (*FSY1*, *HIS3*, *MET2*) (а) и митохондриальных (*FUN14*, *COX2*) (б) генов дрожжей комплекса *Saccharomyces bayanus*. Приводятся значения бутстрапа >70%. Шкала соответствует пяти нуклеотидным заменам на 1000 нуклеотидных позиций. NZ — новозеландская популяция дрожжей *S. bayanus*.

На филогенетическом дереве, построенном по нуклеотидным последовательностям генов *FSY1*, *HIS3* и *MET2*, со 100%-ной статистической поддержкой выделяются два кластера (рис. 2,а). Первый включает два подкластера: *S. bayanus* var. *uvarum* и новозеландские штаммы *S. bayanus*, нуклеотидные последовательности которых отличаются 17–56 заменами. Наибольшие различия отмечены по последовательностям гена *FSY1*. Внутри каждого подкластера штаммы, как правило, имели идентичные последовательности или различались одной–восемью заменами. К первому кластеру примыкает *S. bayanus* var. *bayanus* CBS 425, выделенный из яблочного сока в Швейцарии. Второй кластер также разделен на два подкластера: *S. eubayanus* и *S. bayanus* var. *bayanus*.

По последовательностям митохондриальных генов *FUN14* и *COX2* штаммы *S. bayanus* var. *bayanus* попали в два разных кластера: три штамма (CBS 424, CBS 425, NBRC 1948) вошли в один кластер с дрожжами *S. eubayanus*, а два (CBS 378 и CBS 380) — с *S. bayanus* var. *uvarum* (рис. 2,б). Третий кластер сформировали штаммы новозеландской популяции.

На рис. 3 представлено филогенетическое дерево, построенное по нуклеотидным последовательностям ядерных и митохондриальных генов. Следует отметить, что штаммы новозеландской популяции на всех трех филогенетических дере-

вьях формируют отдельный кластер со статистической поддержкой 99–100%. Эти штаммы значительно отличаются от *S. bayanus* var. *uvarum* по нуклеотидным последовательностям всех пяти проанализированных генов: 55–56 замен (*FSY1*), 16–18 (*MET2*), 24–26 (*HIS3*), 21 замена (*FUN14*) и 43–46 (*COX2*). Различий с дрожжами *S. eubayanus* и *S. bayanus* var. *bayanus* было значительно больше.

Молекулярное кариотипирование и Саузерн-гибридизация

Виды *S. cerevisiae* и *S. bayanus* имеют неколлинеарные кариотипы. В геноме последних дрожжей имеется три реципрокные транслокации, затрагивающие хромосомы XV/VIII, IV/II и X/VI [7, 44]. Последняя транслокация характерна для дрожжей *S. bayanus* var. *uvarum* и отсутствует у штаммов *S. bayanus* var. *bayanus* и *S. eubayanus* [7, 39]. Следует отметить, что молекулярное кариотипирование штаммов *S. bayanus* из новозеландской популяции ранее не проводилось.

Мы сравнили молекулярные кариотипы 33 изученных штаммов. Кариотипы некоторых из них представлены на рис. 4,а. Идентификацию отдельных хромосомных полос проводили по кариотипу стандартного штамма *S. cerevisiae* YNN 295, имеющего известные размеры и порядок хромо-

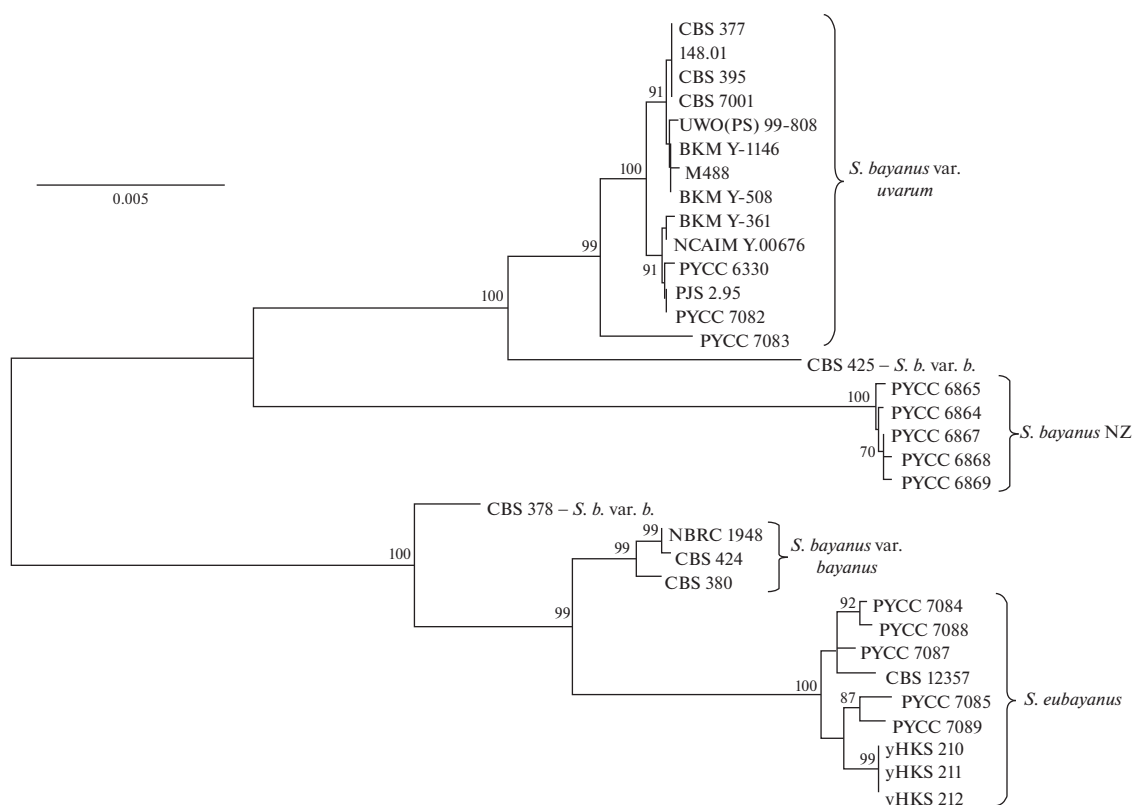


Рис. 3. Филогенетический анализ ядерных (*FSY1*, *HIS3*, *MET2*) и митохондриальных (*FUN14*, *COX2*) генов дрожжей комплекса *Saccharomyces bayanus*. Приводятся значения бутстрепа >70%. Шкала соответствует пяти нуклеотидным заменам на 1000 нуклеотидных позиций. NZ — новозеландская популяция дрожжей *S. bayanus*.

сом (рис. 4,а, дорожка 1). Новозеландские штаммы имеют сходные кариотипические профили, незначительный полиморфизм размеров отмечен только для хромосомных полос размером 2200–770 тпн (дорожки 12–15). Эти штаммы имеют в своем кариотипе три хромосомные полосы размером 245–370 тпн, вместо двух у *S. bayanus* var. *uvarum* (дорожки 10 и 11). Молекулярные кариотипы *S. eubayanus* также характеризовались наличием хромосомы VI размером около 290 тпн (рис. 4,а, дорожки 7–9). Три штамма *S. bayanus* var. *bayanus* (CBS 380, CBS 424 и CBS 425) характеризовались тремя хромосомными полосами размером 245–370 тпн, тогда как у CBS 378 и NBRC 1948 имеется соответственно две и одна хромосомные полосы (дорожки 2–4, 5 и 6). Согласно интенсивности свечения указанные полосы штаммов CBS 378 и NBRC 1948, по-видимому, содержат несколько хромосом. Действительно, с помощью одноступенчатого режима кариотипирования удалось разделить на две хромосомы нижнюю полосу штамма NBRC 1948 и хромосомную полосу размером около 370 тпн у штамма CBS 378 (рисунок не приводится).

Хромосомные ДНК изученных штаммов были перенесены на нитроцеллюлозную мембрану для последующей Саузерн-гибридизации с зондом

ACT1 (хромосома VI) дрожжей *S. cerevisiae* (рис. 4,б). У всех изученных штаммов *S. eubayanus*, новозеландской популяции и трех штаммов *S. bayanus* var. *bayanus* (CBS 380, CBS 424 и CBS 425) зонд *ACT1* гибридизовался к хромосомной полосе размером около 290 тпн, соответствующей хромосоме VI кариотипического стандарта *S. cerevisiae* YNN 295 (рис. 2,б, дорожка 1). У штамма *S. bayanus* var. *bayanus* CBS 378 выявлено два гибридизационных сигнала: var. *bayanus*-типа и var. *uvarum*-типа (рис. 4,б, дорожка 5). У NBRC 1948 и всех изученных штаммов *S. bayanus* var. *uvarum* обнаружен только один гибридизационный сигнал в районе хромосомы размером около 580 тпн (рис. 4,б, дорожки 6, 10 и 11).

Таким образом, реципрокная транслокация между хромосомами VI и X характерна только для *S. bayanus* var. *uvarum* и отсутствует у штаммов новозеландской популяции и *S. eubayanus*. Среди дрожжей *S. bayanus* var. *bayanus* встречаются штаммы обоих типов.

Для определения генетического родства новозеландских и остальных популяций комплекса *S. bayanus* мы провели гибридологический анализ.

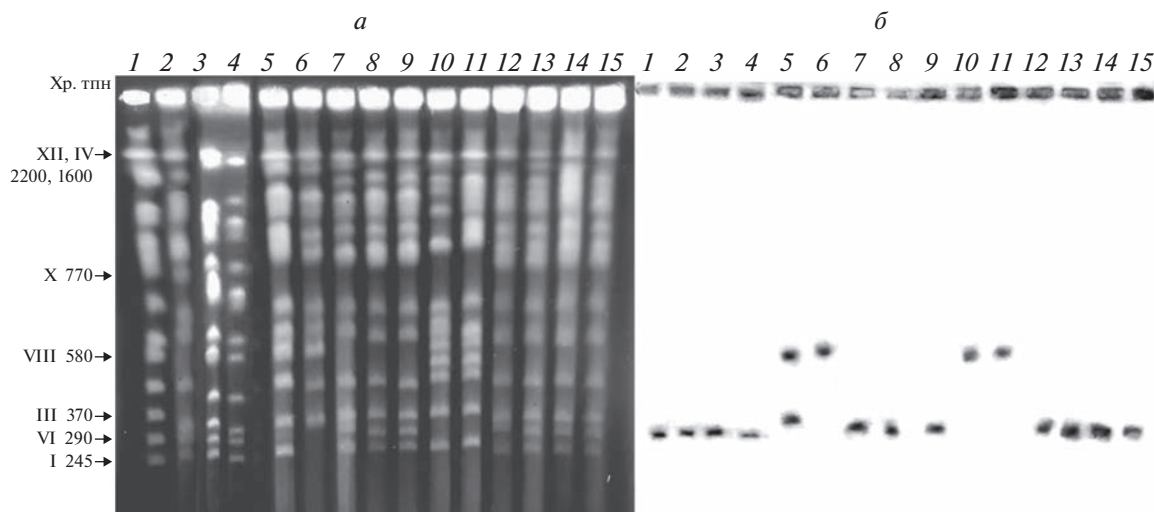


Рис. 4. Пульс-электрофорез (а) и Саузерн-гибридизация (б) хромосомной ДНК дрожжей комплекса *Saccharomyces bayanus* с зондом *ACT1* дрожжей *S. cerevisiae*. *S. bayanus* var. *bayanus*: 2 – CBS 380, 3 – CBS 424, 4 – CBS 425, 5 – CBS 378, 6 – NBRC 1948; *S. eubayanus*: 7 – CBS 12357, 8 – yHKS210, 9 – PYCC 7086; *S. bayanus* var. *uvorum*: 10 – CBS 7001, 11 – CBS 395; новозеландская популяция *S. bayanus*: 12 – PYCC 6864, 13 – PYCC 6867, 14 – PYCC 6868, 15 – PYCC 6869. Нумерация и размеры хромосом приводятся согласно стандартному штамму *S. cerevisiae* YNN295 (дорожка I).

Гибринологический анализ

Были созданы гомозиготные моноспоровые линии штаммов PYCC 6867, PYCC 6868, PYCC 6869 (Новая Зеландия) и NBRC 1948 (*S. bayanus* var. *bayanus*) с высокой выживаемостью аскоспор: 83.3–91.7%. Несколько пониженную выживаемость аскоспор имела только моноспоровая культура новозеландского штамма PYCC 6868: 53.6%. Моноспоровые культуры были маркированы ауксотрофными мутациями *lys* и *ura*. В скрещиваниях использовали ранее полученные ауксотрофные мутанты штаммов CBS 424, CBS 7001, NCAIM Y.00677, UWO(PS) 99-808 и CBS 12357 [7, 38, 45].

Все полученные гибриды спорулировали и были пригодны для тетрадного анализа. Результаты гибринологического анализа представлены в табл. 3. Внутривидовые гибриды PYCC 6867 × PYCC 6869 характеризовались 68.1%-ной выживаемостью аскоспор и регулярным мейотическим расщеплением контрольных ауксотрофных маркеров. С другой стороны, межвидовые гибриды новозеландских штаммов с *S. bayanus* var. *bayanus* (CBS 424, NBRC 1948), *S. bayanus* var. *uvorum* (CBS 7001, NCAIM Y.00677, UWO(PS) 99-808) и *S. eubayanus* (CBS 12357) обладали низкой выживаемостью аскоспор: 6.2–23.3%. Несмотря на полустерильность межвидовых гибридов, во всех гибридных комбинациях наблюдалась рекомбинация родительских маркеров (табл. 3). Заслуживает внимания гибрид *S. bayanus* var. *bayanus* (NBRC 1948) × *S. bayanus* var. *uvorum* (CBS 7001), имеющий достаточно высокую выживаемость аскоспор: 54.3% (табл. 3). Следует отметить, что ранее изученные нами гибриды штам-

мов CBS 380, CBS 424 и CBS 425 (*S. bayanus* var. *bayanus*) и CBS 7001 (*S. bayanus* var. *uvorum*) характеризовались пониженной выживаемостью спор: 9–39% [7, 14, 38].

Мы суммировали результаты гибринологического анализа генетических популяций комплекса *S. bayanus*, полученные в настоящей работе, и ранее опубликованные данные [7, 14, 16, 38, 46]. По выживаемости гибридных аскоспор изученные популяции можно разделить на две группы (рис. 5). Выживаемость аскоспор гибридов *S. bayanus* var. *bayanus* × *S. eubayanus* составила 55–62%, что сопоставимо с фертильностью гибридов при скрещивании разных штаммов *S. bayanus* var. *bayanus*: 64%. Новозеландские штаммы образовывали низко фертильные гибриды со всеми генетическими популяциями: 6.2–23.3%. Низкую выживаемость аскоспор также имели гибриды *S. bayanus* var. *uvorum* с *S. bayanus* var. *bayanus* и *S. eubayanus*: 9–39 и 2.5–11% (рис. 5). Исключением является достаточно фертильный гибрид CBS 7001 × NBRC 1948: 54.5%. Следует отметить, что гибриды штамма NBRC 1948 со штаммами новозеландской популяции, *S. bayanus* var. *bayanus* и *S. eubayanus* характеризовались низкой выживаемостью аскоспор: 17.1–23.4% (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование подтвердило сложное строение комплекса *S. bayanus*, включающего, по крайней мере, четыре генетические популяции: *S. bayanus* var. *bayanus*, *S. bayanus* var. *uvorum*, *S. eubayanus* и новозеландская. Выживаемость ас-

Таблица 3. Анализ гибридов генетических популяций комплекса *S. bayanus*: новозеландская (PYCC 6867, PYCC 6869), *S. bayanus* var. *bayanus* (CBS 424, NBRC 1948), *S. bayanus* var. *ivarum* (CBS 7001, NCAIM Y.00677, UWO(PS) 99-808 и PYCC 7083) и *S. eubayanus* (CBS 12357)

Происхождение гибридов и их генотипы	Число изолированных тетрад	Жизнеспособность аскоспор, %	Мейотическое расщепление гибридов
6867 × 6869 <i>ura/lys</i>	36	68.1	3P:12N:4T*
6867 × 7001 <i>ura/lys</i>	136	11.4	11 <i>ura LYS</i> : 24 <i>URA lys</i> : 22 <i>URA LYS</i> : 5 <i>ura lys</i>
6867 × 00677 <i>ura/lys</i>	105	6.2	1 <i>ura LYS</i> : 12 <i>URA lys</i> : 9 <i>URA LYS</i> : 4 <i>ura lys</i>
6867 × 99-808 <i>ura/lys</i>	101	23.3	10 <i>ura LYS</i> : 19 <i>URA lys</i> : 37 <i>URA LYS</i> : 28 <i>ura lys</i>
6867 × 424 <i>ADE/ade</i>	35	18.6	10 <i>ADE</i> : 16 <i>ade</i>
6869 × 1948 <i>lys/ura</i>	29	19.0	6 <i>ura LYS</i> : 6 <i>URA lys</i> : 3 <i>URA LYS</i> : 7 <i>ura lys</i>
6867 × 12357 <i>ura/lys</i>	118	19.5	14 <i>ura LYS</i> : 34 <i>URA lys</i> : 31 <i>URA LYS</i> : 13 <i>ura lys</i>
7083 × 12357 <i>ura/lys</i>	20	2.5	2 <i>URA lys</i>
1948 × 7001 <i>LYS/lys</i>	35	54.3	44 <i>LYS</i> : 32 <i>lys</i>
1948 × 424 <i>ADE/ade</i>	31	23.4	17 <i>ADE</i> : 12 <i>ade</i>
1948 × 12357 <i>ura/lys</i>	19	17.1	2 <i>ura LYS</i> : 4 <i>URA lys</i> : 5 <i>URA LYS</i> : 2 <i>ura lys</i>

* Соотношение тетрад родительского (P), неродительского (N) дитипов и тетратипа (T).

коспор существенно зависела от родительских комбинаций и составила 55–62% у гибридов *S. bayanus* var. *bayanus* × *S. eubayanus*, 9–39% у *S. bayanus* var. *bayanus* × *S. bayanus* var. *ivarum* и 2.5–11% у *S. bayanus* var. *ivarum* × *S. eubayanus* (рис. 5). Результаты гибридологического и молекулярного анализов свидетельствуют о генетической дивер-

генции штаммов новозеландской популяции, которые значительно отличаются по всем пяти изученным молекулярным маркерам и образуют полустерильные гибриды с представителями остальных популяций: 6.2–23.3% (рис. 5). Независимо от выживаемости аскоспор у всех изученных гибридов наблюдалось регулярное мейотическое расщеп-

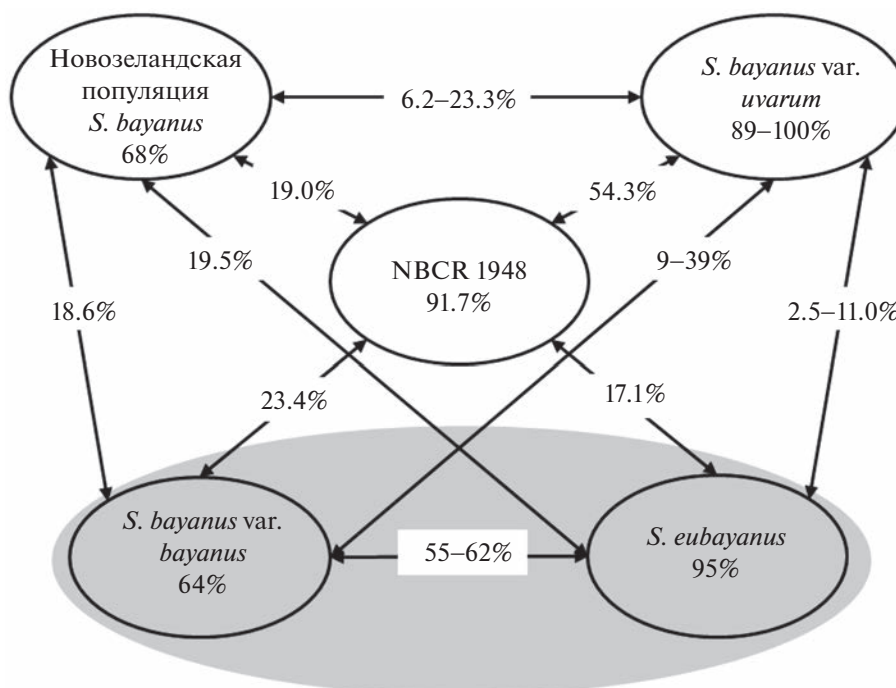


Рис. 5. Суммарные результаты гибридологического анализа генетических популяций комплекса *Saccharomyces bayanus* ([7, 14–18, 38, 46]; настоящее исследование).

ление контрольных маркеров, включая двойные ауксотрофы. Внутрипопуляционные скрещивания были фертильны и также характеризовались мейотической рекомбинацией контрольных маркеров. Проведенный нами ранее гибридологический анализ более 100 штаммов *S. bayanus* var. *uvarum*, выделенных из различных ферментационных и природных источников в разных регионах мира (Западной, Центральной и Восточной Европы, Дальневосточной и Юго-восточной Азии, Северной и Южной Америки, Гавайских островов), выявил высокую выживаемость гибридных аскоспор: 89–100% [1, 15–18, 46]. Дрожжи *S. eubayanus* также обнаружены в разных регионах мира: Аргентине, Чили, США, Канаде, Китае, Австралии и Новой Зеландии [24, 32–35]. С другой стороны, все известные штаммы дрожжей *S. bayanus* var. *bayanus* были выделены исключительно в Европе, в основном из пивоварения [7, 13].

С помощью ПДРФ-анализа межгенного спейсера IGS2 рДНК можно четко дифференцировать *S. bayanus* var. *uvarum* и новозеландские изоляты от штаммов *S. bayanus* var. *bayanus* и *S. eubayanus*, имеющих идентичные *AluI*-паттерны. Сравнительный анализ ядерных и митохондриальных генов также выявил более близкое генетическое родство последних двух популяций. Характерная для *S. bayanus* var. *uvarum* реципрокная транслока-

ция, затрагивающая хромосомы VI и X, отсутствует у штаммов *S. bayanus* var. *bayanus*, *S. eubayanus* и новозеландской популяции. Исключением являются выделенные из пивоварения штаммы *S. bayanus* var. *bayanus* NBRC 1948 и CBS 378, у которых также имеется указанная реципрокная транслокация. Следует отметить, что гибрид штамма NBRC 1948 с *S. bayanus* var. *uvarum* CBS 7001 имел 54%-ную выживаемость аскоспор, тогда как гибрид NBRC 1948 × *S. bayanus* var. *bayanus* CBS 424 был полустерильным: 23.4%. По-видимому, европейская популяция *S. bayanus* var. *bayanus* является связующим звеном между *S. eubayanus* и *S. bayanus* var. *uvarum*.

Таким образом, между *S. bayanus* var. *bayanus*, *S. bayanus* var. *uvarum*, *S. eubayanus* и новозеландской популяцией нет полной межвидовой постзиготической изоляции. Согласно полученным генетическим и молекулярным данным указанные таксоны относятся к одному биологическому виду, обладая дивергенцией геномов на уровне таксономических разновидностей.

Исследование выполнено в рамках государственного задания АААА-А20-120093090015-2.

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

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Наумов Г.И., Наумова Е.С., Мартыненко Н.Н., Маснёф-Помаред И. Таксономия, экология и генетика дрожжей *Saccharomyces bayanus* — нового объекта в науке и практике // Микробиология. 2011. Т. 80. № 6. С. 723–730.
2. Vaughan-Martini A., Martini A. *Saccharomyces* Meyen ex Reess (1870) // The Yeast, a Taxonomic Study / Eds Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. 5th ed. Amsterdam: Elsevier, 2011. V. 2. P. 733–746. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00061-6>
3. Naumov G.I., James S.A., Naumova E.S. et al. Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2000. V. 50. P. 1931–1942. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-5-1931>
4. Kurtzman C.P. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the Saccharomycetaceae, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vandervatozyma* and *Zygorulasporea* // FEMS Yeast Res. 2003. V. 4. P. 233–245. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00175-2](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00175-2)
5. Wang S.A., Bai F.Y. *Saccharomyces arboricolus* sp. nov., a yeast species from tree bark // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2008. V. 58. P. 510–514. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.65331-0>
6. Naseeb S., James S.A., Alsammar H. et al. *Saccharomyces jurei* sp. nov., isolation and genetic identification of a novel yeast species from *Quercus robur* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 2046–2052. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002013>
7. Naumova E.S., Naumov G.I., Masneuf-Pomarede I. et al. Molecular genetic study of introgression between *Saccharomyces bayanus* and *S. cerevisiae* // Yeast. 2005. V. 22. P. 1099–1115. <https://doi.org/10.1002/yea.1298>
8. Peris D., Pérez-Torrado R., Hittinger C.T. et al. On the origins and industrial applications of *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces kudriavzevii* hybrids // Yeast. 2018. V. 35. P. 51–69. Epub 2017 Dec 6. <https://doi.org/10.1002/yea.3283>
9. Morard M., Benavent-Gil Y., Ortiz-Tovar G. et al. Genome structure reveals the diversity of mating mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces kudriavzevii* hybrids, and the genomic instability that promotes phenotypic diversity // Microbial. Genomics. 2020. V. 6(3). P. e000333. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000333>
10. Lopandic K. *Saccharomyces* interspecies hybrids as model organisms for studying yeast adaptation to stressful environments // Yeast. 2018. V. 35. P. 21–38. <https://doi.org/10.1002/yea.3294>
11. Bendixsen D.P., Frazão J.G., Stelkens R. *Saccharomyces* yeast hybrids on the rise // Yeast. 2022. V. 39. P. 40–54. <https://doi.org/10.1002/yea.3684>
12. Nguyen H.-V., Gaillardin C. Two subgroups within the *Saccharomyces bayanus* species evidenced by PCR amplification and restriction polymorphism of the non-transcribed spacer 2 in the ribosomal DNA unit // Syst. Appl. Microbiol. 1997. V. 20. P. 286–294. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(97\)80075-6](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(97)80075-6)
13. Pérez-Través L., Lopes C.A., Querol A., Barrio E. On the complexity of the *Saccharomyces bayanus* taxon: Hybridization and potential hybrid speciation // PLoS One. 2014. V. 9(4). P. e93729. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093729>
14. Наумов Г.И. Новая разновидность *S. bayanus* var. *uvarum*, установленная генетическим анализом // Микробиология. 2000. Т. 69. № 2. С. 410–414.
15. Naumov G.I., Naumova E.S., Gaillardin C. Genetic and karyotypic identification of wine *Saccharomyces bayanus* yeasts isolated in France and Italy // Syst. Appl. Microbiol. 1993. V. 16. P. 274–279. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80480-7](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80480-7)
16. Naumov G.I., Masneuf I., Naumova E.S. et al. Association of *S. bayanus* var. *uvarum* with some French wines: Genetic analysis of yeast populations // Res. Microbiol. 2000. V. 151. P. 683–691. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(00\)90131-1](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(00)90131-1)
17. Naumov G.I., Naumova E.S., Aigle M. et al. Genetic reidentification of the pectinolytic yeast strain SCPP as *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001. V. 55. P. 108–111. <https://doi.org/10.1007/s002530000480>
18. Naumov G.I., Nguyen H.-V., Naumova E.S. et al. Genetic identification of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*, a cider-fermenting yeast // Int. J. Food. Microbiol. 2001. V. 65. P. 163–171. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00515-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00515-8)
19. Masneuf-Pomarede I., Le Jeune C., Durrens P. et al. Molecular typing of wine yeast strains *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* using microsatellite markers // System. Appl. Microbiol. 2007. V. 30. P. 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2006.02.006>
20. Almeida P., Gonçalves C., Teixeira S. et al. A gondwanan imprint on global diversity and domestication of wine and cider yeast *Saccharomyces uvarum* // Nat. Commun. 2014. V. 5. P. 4044–4055. <https://doi.org/10.1038/ncomms5044>
21. Zhang H., Richards K.D., Wilson S. et al. Genetic characterization of strains of *Saccharomyces uvarum* from New Zealand wineries // Food Microbiol. 2015. V. 46. P. 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.07.016>
22. Rodríguez M.E., Pérez-Través L., Sangorrín M.P. et al. *Saccharomyces uvarum* is responsible for the traditional fermentation of apple chicha in Patagonia // FEMS Yeast Res. 2017. V. 17(1). P. fow109. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow109>
23. McCarthy G.C., Morgan S.C., Martiniuk J.T. et al. An indigenous *Saccharomyces uvarum* population with high genetic diversity dominates uninoculated Char-

- donnay fermentations at a Canadian winery // PLoS One. 2021. V. 16(2). P. e0225615.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225615
24. Libkind D., Hittinger C.T., Valério E. et al. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. P. 14539–14544.
https://doi.org/10.1073/pnas.1105430108
 25. Pulvirenti A., Nguyen H.V., Caggia C. et al. *Saccharomyces uvarum*, a proper species within *Saccharomyces sensu stricto* // FEMS Microbiol. Lett. 2000. V. 192. P. 191–196.
https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09381.x
 26. Nguyen H.V., Gaillardin C. Evolutionary relationships between the former species *Saccharomyces uvarum* and the hybrids *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus*; reinstatement of *Saccharomyces uvarum* (Beijerinck) as a distinct species // FEMS Yeast Res. 2005. V. 5. P. 471–483.
https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.12.004
 27. Rainieri S., Kodama Y., Kaneko Y. et al. Pure and mixed genetic lines of *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus* and their contribution to the lager brewing strain genome // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. P. 3968–3974.
https://doi.org/10.1128/AEM.02769-05
 28. Nguyen H.-V., Lepingle A., Gaillardin C. Molecular typing demonstrates homogeneity of *Saccharomyces uvarum* strains and reveals the existence of hybrids between *S. uvarum* and *S. cerevisiae*, including the *S. bayanus* type strain CBS 380 // System. Appl. Microbiol. 2000. V. 23. P. 71–85.
https://doi.org/10.1016/S0723-2020(00)80048-X
 29. Rainieri S., Zambonelli C., Hallsworth J.E. et al. *Saccharomyces uvarum*, a distinct group within *Saccharomyces sensu stricto* // FEMS Microbiol. Lett. 1999. V. 177. P. 177–185.
https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13729.x
 30. Bon E., Neuveglise C., Casaregola S. et al. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 5. *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* // FEBS Lett. 2000. V. 487. P. 37–41.
https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02276-6
 31. Nguyen H.-V., Legras J.L., Neuveglise C., Gaillardin C. Deciphering the hybridisation history leading to the Lager lineage based on the mosaic genomes of *Saccharomyces bayanus* strains NBRC 1948 and CBS 380 // PLoS One. 2011. V. 6(10). P. e25821.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025821
 32. Bing J., Han P.J., Liu W.Q. et al. Evidence for a Far East Asian origin of lager beer yeast // Curr. Biol. 2014. V. 24. P. 380–381.
https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.04.031
 33. Peris D., Langdon Q.K., Moriarty R.V. et al. Complex ancestries of lager-brewing hybrids were shaped by standing variation in the wild yeast *Saccharomyces eubayanus* // PLoS Genet. 2016. V. 12. P. 1–20.
https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006155
 34. Gayevskiy V., Goddard M.R. *Saccharomyces eubayanus* and *Saccharomyces arboricola* reside in North Island native New Zealand forests // Environ. Microbiol. 2016. V. 18. P. 1137–1147.
https://doi.org/10.1111/1462-2920.13107
 35. Nespolo R.F., Villarroel C.A., Oporto C.I. et al. An out-of-patagonia migration explains the worldwide diversity and distribution of *Saccharomyces eubayanus* lineages // PLoS Genetics. 2020. V. 16(5). e1008777.
https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008777
 36. Baker E., Wang B., Bellora N. et al. The genome sequence of *Saccharomyces eubayanus* and the domestication of Lager-brewing yeasts // Mol. Biol. Evol. 2015. V. 32(11). P. 2818–2831.
https://doi.org/10.1093/molbev/msv168
 37. Heblly M., Brickwedde A., Bolat I. et al. *S. cerevisiae* × *S. eubayanus* interspecific hybrid, the best of both worlds and beyond // FEMS Yeast Res. 2015. V. 15. № 3. P. fov005.
https://doi.org/10.1093/femsyr/fov005
 38. Наумов Г.И. Генетическое родство и биологический статус индустриально важных дрожжей *Saccharomyces eubayanus* Sampaio et al. // ДАН. 2017. V. 473(5). P. 622–625.
https://doi.org/10.7868/S0869565217110263
 39. Sampaio J.P. Microbe Profile: *Saccharomyces eubayanus*, the missing link to lager beer yeasts // Microbiology. 2018. V. 164. P. 1069–1071.
https://doi.org/10.1099/mic.0.000677
 40. Lōoke M., Kristjuhan K., Kristjuhan A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR based applications // Biotechniques. 2011. V. 50. P. 325–328.
https://doi.org/10.2144/000113672
 41. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets // Mol. Biol. Evol. 2016. V. 33. № 7. P. 1870–1874.
https://doi.org/10.1093/molbev/msw054
 42. Boek J., La Croute D., Fink G.R. A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity // Mol. Gen. Genet. 1984. V. 197. P. 345–346.
 43. Sherman F., Fink G.R., Hicks J.B. Laboratory course manual for methods in yeasts genetics // Methods in Yeast Genetics: A Gold Spring Harbor Laboratory Course Manual. N.Y.: Gold Spring Harbor Lab., 1986. P. 50–51.
 44. Fischer G., James S.A., Roberts I.N. et al. Chromosomal evolution in *Saccharomyces* // Nature. 2000. V. 405. P. 451–454.
 45. Kaneko Y., Banno I. Isolation and genetic characterization of auxotrophic mutants in *Saccharomyces bayanus* // IFO Res. Comm. 1989. V. 14. P. 104–110.
 46. Наумов Г.И., Газдиев Д.О., Наумова Е.С. Обнаружение биологического вида *Saccharomyces bayanus* в Дальневосточной Азии // Микробиология. 2003. Т. 72. № 6. С. 834–839.

Genetically Isolated Population of *Saccharomyces bayanus* in New Zealand and Australia

A. N. Borovkova^{a, b}, G. I. Naumov^a, A. V. Shnyreva^b, and E. S. Naumova^{a, *}

^aNational Research Center "Kurchatov Institute", Kurchatov Complex
for Genetic Research (GosNIIGenetika), Moscow, 123098 Russia

^bMoscow State University, Moscow, 119234 Russia

*e-mail: lena_naumova@yahoo.com

The genetic relatedness of yeasts in the *Saccharomyces bayanus* complex has been studied using the methods of molecular and classical genetics. A divergent population of *S. bayanus* has been found in New Zealand and Australia. The *S. bayanus* complex includes four genetic populations: *S. bayanus* var. *bayanus*, *S. bayanus* var. *uvarum*, *S. eubayanus* and New Zealand population. The strains of the New Zealand population differ significantly in the nucleotide sequences of nuclear (*FSY1*, *HIS3*, *MET2*) and mitochondrial (*FUN14*, *COX2*) genes and form semi-sterile hybrids with other populations: viability of ascospores is 6.2–23.3%. There is no complete interspecific postzygotic isolation between *S. bayanus* var. *bayanus*, *S. bayanus* var. *uvarum*, *S. eubayanus*, and New Zealand populations: all hybrids showed regular meiotic segregation of control auxotrophic markers. According to the results obtained, four genetic populations belong to the same biological species with genomic divergence at the level of taxonomic varieties.

Keywords: *Saccharomyces bayanus* complex, *S. bayanus* var. *bayanus*, *S. bayanus* var. *uvarum*, *S. eubayanus*, New Zealand population, genetic hybridization and phylogenetic analyses, molecular karyotyping.

НОВЫЙ АЛЛЕЛЬ 5'-UTR *LcyE* КОРРЕЛИРУЕТ С ПОВЫШЕННОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНА ЛИКОПИН-ε-ЦИКЛАЗЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩЕЙ ПОТОК ВЕТВИ β-ε ПУТИ БИОСИНТЕЗА КАРОТИНОИДОВ У КУКУРУЗЫ

© 2023 г. Д. Х. Архестова^{1,2}, Г. И. Ефремов¹ *, С. П. Аппаев², Е. З. Кочиева¹, А. В. Щенникова¹

¹Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

²Институт сельского хозяйства — филиал Кабардино-Балкарского научного центра Российской академии наук, Нальчик, 360004 Россия

*e-mail: gleb_efremov@mail.ru

Поступила в редакцию 22.04.2022 г.

После доработки 26.05.2022 г.

Принята к публикации 31.05.2022 г.

Окраска зерна кукурузы *Zea mays* L. определяется содержанием и составом каротиноидов, в том числе провитамина А, являющегося продуктом ветвей β-β (β-каротин, β-криптоксантин) и β-ε (α-каротин) каротиногенеза. Соотношение потоков ветвей зависит от активности ликопин-ε-циклазы *LcyE*, определяющей ветвь β-ε. В данной работе проведен анализ аллельных вариантов гена *LcyE*, потенциально эффективных для повышения биосинтеза β-каротина, у 20 инбредных линий кукурузы отечественной селекции, различающихся окраской зерна. Амплифицированы и секвенированы участки 5'-UTR гена *LcyE*. Анализ фрагментов показал присутствие аллеля “2” у четырех линий и нового аллеля “5” у 16 линий. Охарактеризован полиморфизм нового аллеля “5” — четыре мононуклеотидных полиморфизма и две делеции. Проведенное сравнение цис-регуляторных элементов в анализируемой области 5'-UTR аллелей “2” и “5” обнаружило различие в сайтах связывания с транскрипционными факторами. Экспрессия гена *LcyE* определена в листьях двух линий с аллелем “2” и трех — с аллелем “5”. Показана прямая зависимость между присутствием аллеля “5” и снижением экспрессии гена: уровень транскрипции гена в случае аллеля “2” в 10–15 раз выше, чем в случае аллеля “5”. Предполагаем, что наличие в геноме кукурузы аллеля “5” гена *LcyE* коррелирует со снижением или подавлением экспрессии данного гена и, при стабильной активности других ферментов каротиногенеза, с окраской зерна. Использование доноров аллеля “5” в комбинации с известной темно-желтой или оранжевой окраской зерна может быть использовано в селекции кукурузы с повышенным синтезом провитамина А в зерне.

Ключевые слова: *Zea mays* L., инбредные линии кукурузы, биосинтез каротиноидов, провитамины А, ликопин-ε-циклаза, экспрессия гена, 5'-UTR-полиморфизм.

DOI: 10.31857/S0016675823030025, **EDN:** INSQAK

Окраска зерна является важной характеристикой инбредных линий кукурузы *Zea mays* L., так как свидетельствует о наличии диетически ценных вторичных метаболитов — каротиноидов, и определяется содержанием и соотношением преимущественно лютеина, зеаксантина, β-каротина, β-криптоксантина и α-каротина [1]. Отсутствие каротиноидов или только цветных каротиноидов соответствует белой окраске зерна, тогда как обогащение зеаксантином или лютеином — оранжевой или желтой соответственно [2, 3].

В традиционных сортах кукурузы каротиноиды, являющиеся предшественниками дефицитного витамина А (β-каротин, β-криптоксантин и α-каротин), составляют всего 0.5–2.5 мкг/г сырого веса зерна [1, 4, 5]. β-Каротин и β-криптоксантин яв-

ляются производными метаболической ветви β-β пути биосинтеза каротиноидов (рис. 1,а), когда под действием ликопин β-циклазы (*LcyB*) на обоих концах линейной молекулы ликопина формируются β-иононовые кольца (β-каротин, продукты гидроксирования β-каротина — ксантофиллы, включая зеаксантин и β-криптоксантин) [6, 7]. α-Каротин является продуктом ветви β-ε (рис. 1,а) и представляет собой молекулу с β-иононовым кольцом на одном конце и ε-иононовым кольцом на другом конце изопреноидной цепи, образующуюся в результате совместного действия *LcyB* и ликопин-ε-циклазы (*LcyE*) (конечный продукт ветви β-ε — лютеин) [6, 7]. Благодаря присутствию в структуре двух β-иононовых колец окислительное расщепление β-каротина дает две молекулы вита-

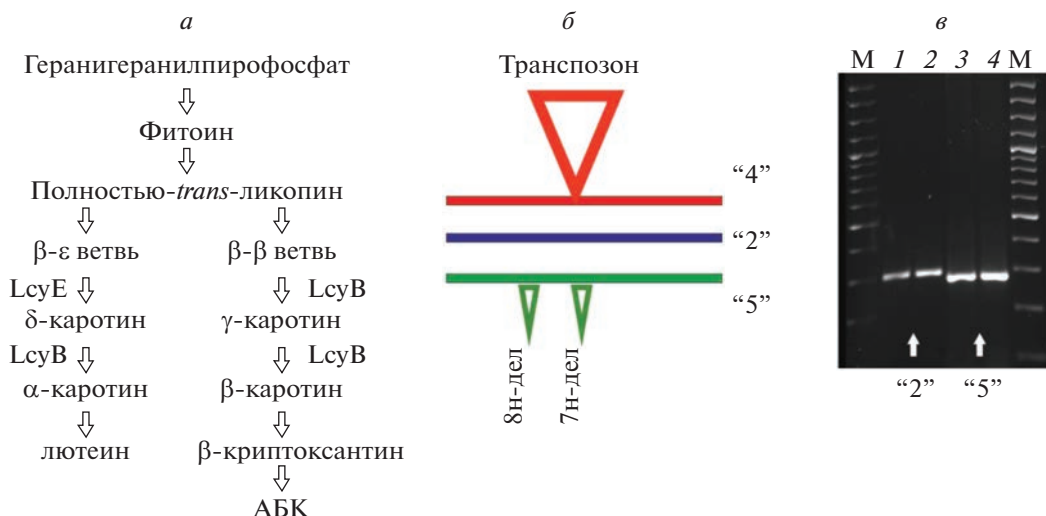


Рис. 1. *а* — схема биосинтеза каротиноидов. Ветвь β - β начинается с синтеза δ -каротина (*LcyE*), который далее преобразуется в α -каротин (*LcyB*). Ветвь β - ϵ начинается с синтеза γ -каротина (*LcyB*), который далее преобразуется в β -каротин (*LcyB*). *б* — схематичное изображение аллелей 5'-UTR *LcyE*. Аллель "2" — аллель дикого типа; аллель "4" — аллель со вставкой транспозона (650 или 993 пн), предпочтительный для синтеза провитамина А [1, 11]; новый аллель "5" отличается от аллеля "2" двумя делециями (8 и 7 пн) и четырьмя SNPs. *в* — электрофоретическое разделение продуктов ПЦР на геномной ДНК кукурузы различных инбредных линий, соответствующих аллелям "2" и "5".

мина А. Поэтому β -каротин считается наиболее значимым предшественником витамина А в сравнении с α -каротином и β -криптоксантином (по одному β -кольцу) [8–10].

Характерным признаком преобладания ветви β - β каротиногенеза и, одновременно, потенциально более высокого содержания провитамина А, является оранжевая окраска зерна кукурузы [1, 5, 11]. Интересно при этом, что в традиционных линиях кукурузы в тканях зародыша зерна преимущественно действует ветвь β - β , тогда как в эндосперме — ветвь β - ϵ , и это ассоциировано с дифференциальной экспрессией генов ликопин-циклаз *LcyB* и *LcyE* [1, 12, 13].

Ранее посредством ассоциативного картирования, в последовательности гена *LcyE* были описаны полиморфные варианты, связанные с пониженной экспрессией гена и, соответственно, повышенным содержанием провитамина А [1]. Доноры мутантных аллелей *lcyE* активно использовались в селекции линий кукурузы, продуцирующих обогащенное провитамином А зерно [5, 11, 14]. Наибольший эффект наблюдался в случае полиморфных вариантов в области 5'-UTR (*lcyE* 5'TE) по сравнению с мутациями в экзоне 1 (*lcyE* SNP216), интроне 4 (*lcyE* SNP2238) и делецией в 3'-UTR (*lcyE* 3'InDel) [1]. При этом инсерции мобильных элементов в 5'-UTR рядом с точкой инициации трансляции (аллели "1" и "4") были ассоциированы с самыми значительными изменениями соотношения синтеза каротиноидов у ветвей β - ϵ и β - β [1]. Последующие исследования подтвердили существенный рост накопления витамина А в

зернах кукурузы в случае аллеля "4" [5, 11]. Поэтому биофортификация кукурузы для получения линий с повышенным содержанием провитамина А сфокусирована главным образом на снижении экспрессии гена *LcyE* путем использования в селекции генотипов с соответствующими аллелями [1, 4, 11]. Подобная корреляция между присутствием определенных аллелей и синтезом провитамина А консервативна у высших растений, что продемонстрировано на примере модельного вида *Arabidopsis thaliana*, рапса *Brassica napus* и картофеля *Solanum tuberosum* [14–16]. В некоторых генотипах пшеницы *Triticum turgidum* также идентифицированы мутации в последовательности *LcyE*, которые потенциально могут приводить к повышению синтеза β -каротина [17].

Помимо гена *LcyE* к повышению синтеза провитамина А могут приводить мутации в гене β -каротин-гидроксилазы 1 (*CrtRB1*) — участнике ветви β - β . Сочетание у генотипа кукурузы мутантных аллелей *lcyE* и *crtRB1* увеличивает содержание β -каротина на порядок, поскольку выключение/снижение активности гена *LcyE* смещает равновесие в сторону ветви β - β , а выключение/снижение активности гена *CrtRB1* ограничивает гидроксилирование β -каротина до ксантофиллов [1, 11, 18–20].

В данной работе был проведен анализ инбредных линий кукурузы отечественной селекции на предмет наличия аллельных вариантов 5'-UTR гена *LcyE*, потенциально эффективных для повышения биосинтеза провитамина А.

Таблица 1. Линии кукурузы, использованные в работе

Номер линии	Окраска зерна	Аллель “2”	Аллель “5”
2137 ¹	Белая	+	+
2473 ²			
5254-1 ²			+
5320-5 ²			+
6097-1 ²			+
5127-4 ²	Бледно-желтая		+
6004-1 ²			+
6172-2 ²			+
6639-1 ²			+
2465 ²		+	
1543 ¹	Насыщенно-желтая		+
5692 ¹			+
5702 ¹			+
5057-8 ²		+	
5580-1 ²			+
5074-1 ²	Коричневый низ, желтый верх		+
5570-4 ²	Оранжевая		+
6466-1 ²			+
5272-6 ²			+
5677 ¹		+	

Примечание. ¹ ООО ИП АФ “ОТБОР”, ² ИСХ КБНЦ РАН.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. В работе использовали 20 инбредных линий кукурузы из коллекции ИСХ КБНЦ РАН и ООО ИП АФ “ОТБОР” (Кабардино-Балкария, Россия) (табл. 1). Растения выращивали в 2021 г. в полевых условиях (ИСХ КБНЦ РАН, КБР, Россия). Самоопыленные початки собирали, отдельные зерна проращивали до формирования 2–4 истинных листьев (23/25°C, 16/8 ч – день/ночь, ЭУИК ФИЦ Биотехнологии РАН). Листовой материал использовали для анализа генной вариабельности и экспрессии.

Идентификация и анализ полиморфизмов в последовательности 5'-нетранслируемой области (5'-UTR) гена *LcyE*. Для идентификации аллелей *LcyE*, из собранного листового материала выделяли геномную ДНК, согласно [21]. Полученные препараты затем использовали как матрицы для ПЦР-амплификации участка последовательности 5'-UTR гена *LcyE*. Программа амплификации: ис-

ходная денатурация в течение 5 мин при 95°C, далее 32 цикла (денатурация 1 мин при 95°C, отжиг 30 с при 60°C, синтез 45 с при 72°C).

Предположительные продукты амплификации с праймерами F2 (5'-AAGCATCCGACCAAATAACAG-3') и R2 (5'-GAGAGGGAGACGACGAGACAC-3') – фрагменты ДНК 248 или 993 пн (в зависимости от аллельного варианта) в соответствии с [1].

Фрагменты ожидаемой длины вырезали из геля (Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit, “ZymoResearch”, США) и секвенировали с праймера F2 на автоматическом секвенаторе ABI 310 Capillary DNA Analyzer (“Applied Biosystems”, США; ЦКП “Биоинженерия” РАН).

Структурный анализ проводили с помощью NCBI-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и MEGA 7.0 [22]. Поиск цис-регуляторных элементов в анализируемом участке 5'-UTR осуществляли с использованием PlantCARE [23].

Анализ экспрессии гена *LcyE*. Суммарную РНК выделяли из 50–100 мг ткани листьев (RNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN, Германия), дополнительно очищали от примесей ДНК (RNase-free DNasey set, QIAGEN, Германия) и использовали для синтеза кДНК (GoScript™ Reverse Transcription System, Promega, США) согласно протоколам производителей. Качество РНК проверяли методом электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле. Концентрацию РНК и кДНК определяли на флуориметре Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США) с помощью соответствующих реактивов (Qubit RNA HS Assay Kit и Qubit DS DNA HS Assay Kit, Invitrogen, США).

Экспрессию гена *LcyE* в листьях линий кукурузы определяли методом ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР) с нормализацией данных по референсному гену *Zea mays polyubiquitin* (NM_001329666.1; праймеры ZmUBI-rtF 5'-ATCGTGGTTGTGGCTTCGTTG-3' и ZmUBI-rtR 5'-GCTGCAGAAGAGTTTTGGGTACA-3'). Для проведения реакции использовали 3 нг кДНК-матрицы, кДНК-специфичные праймеры (ZmLcyE-F 5'-TTTACGTGCAATGCAGTCAA-3' и ZmLcyE-R: 5'-TGACTCTGAAGCTAGAGAAAG-3'), набор “Реакционная смесь для проведения РВ-ПЦР в присутствии SYBR GreenI и ROX” (ООО “Синтол”, Россия) и термоциклер CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США). Реакции проводили в двух биологических и трех технических повторах. Программа амплификации: исходная денатурация в течение 5 мин при 95°C, далее 40 циклов (денатурация 15 с при 95°C; отжиг и синтез 40 с при 60°C).

Результаты РВ-ПЦР статистически обрабатывали с помощью GraphPadPrismv.8 (GraphPad Software Inc., США; <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>). Данные выражали как среднее значение со стандартным отклонением ($\pm$ SD) на основе двух биологических и трех технических повторов. Для оценки достоверности различий в экспрессии гена между линиями кукурузы использовали *t*-критерий Уэлча (unequal variance, Welch's *t*-test) (при $p < 0.05$ различия статистически значимы).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

*Идентификация и структурный анализ участка последовательности 5'-UTR гена *LcyE* у инбредных линий кукурузы*

Для выявления возможных полиморфных вариантов участка 5'-UTR гена *LcyE*, потенциально влияющих на уровень экспрессии *LcyE*, в работе использованы 20 инбредных линий кукурузы, различающихся окраской зерна (табл. 1), что говорит о вариациях в содержании и составе каротиноидов.

Основываясь на приведенных данных, 20 инбредных линий кукурузы были протестированы на возможное присутствие либо аллеля “2”, либо аллеля “4” гена *LcyE* (рис. 1,б), где последний ассоциирован с повышенным накоплением провитамина А [1]. Амплификация соответствующего участка 5'-UTR и электрофоретический анализ ПЦР-продуктов показали отсутствие фрагментов, соответствующих аллелю “4” [1]. При этом, независимо от окраски зерна, в геномах анализируемых линий присутствовал один из двух типов фрагментов размером ~230 или ~250 пн (рис. 1,в). Фрагмент длиной ~230 пн ранее не был описан. Размер ~250 пн теоретически соответствует аллелю “2” (248 пн) *LcyE*, неблагоприятному для повышенного синтеза провитамина А, согласно [1].

Секвенирование полученных фрагментов обнаружило, что четыре линии из 20 (по одной из каждой группы, различающейся по окраске зерна) содержат аллель “2” (табл. 1). Секвенирование фрагмента 5'-UTR *LcyE* длиной 233 пн, обозначенного как аллель “5” и присутствующего у оставшихся 16 линий, выявило две делеции (размером 8 и 7 нуклеотидов) и четыре мононуклеотидных полиморфных варианта (рис. 2,а).

Сравнительный анализ последовательности аллеля “5” с доступными данными в базе GenBank NCBI обнаружил последовательности 5'-UTR *LcyE*, гомологичные по первой и/или второй делеции. Таким образом, аллель “5” встречается с большой частотой (табл. 1), что может свидетельствовать о родственном происхождении линий и косвенно подтверждается общностью их ординаторов (ИСХ КБНЦ РАН или ООО ИП АФ “ОТБОР”; КБР, Россия).

*Уровень экспрессии гомологов гена *LcyE* у линий кукурузы коррелирует с присутствием аллеля “5”*

Ранее было показано, что полиморфные варианты последовательности гена *LcyE* часто имеют критическое значение для работы фермента, и, в основном, это варианты, влияющие на уровень транскрипции гена [1, 11]. При этом предполагается высокий функциональный консерватизм *LcyE* для всех типов тканей, где может идти синтез каротиноидов, поскольку в геноме кукурузы отсутствуют другие гены, паралоги *LcyE*, в отличие, к примеру, от ключевого фермента биосинтеза каротиноидов – фитоинсинтазы PSY, имеющей три паралога (PSY1–3) с функциональной и тканевой специфичностью [24, 25].

Для оценки влияния типа аллеля на уровень экспрессии гена *LcyE* проанализированы образцы пяти линий, две из которых содержат аллель “2” и три – новый аллель “5”. Обнаружено, что уровень транскрипции гена в листьях образцов с аллелем “2” в 10–15 раз выше, чем у образцов с

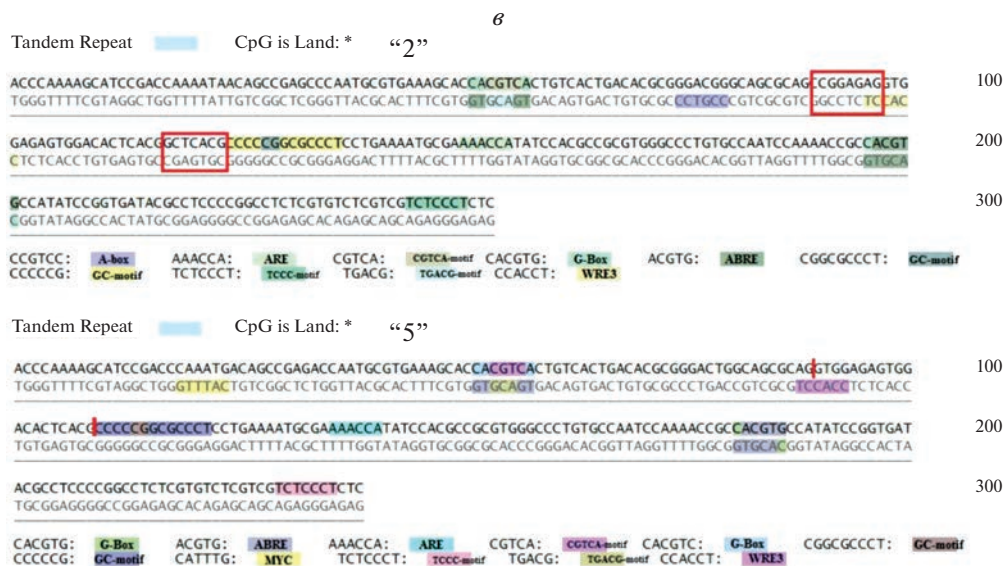
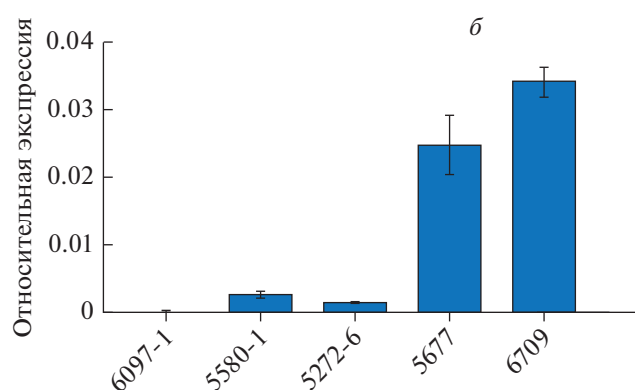
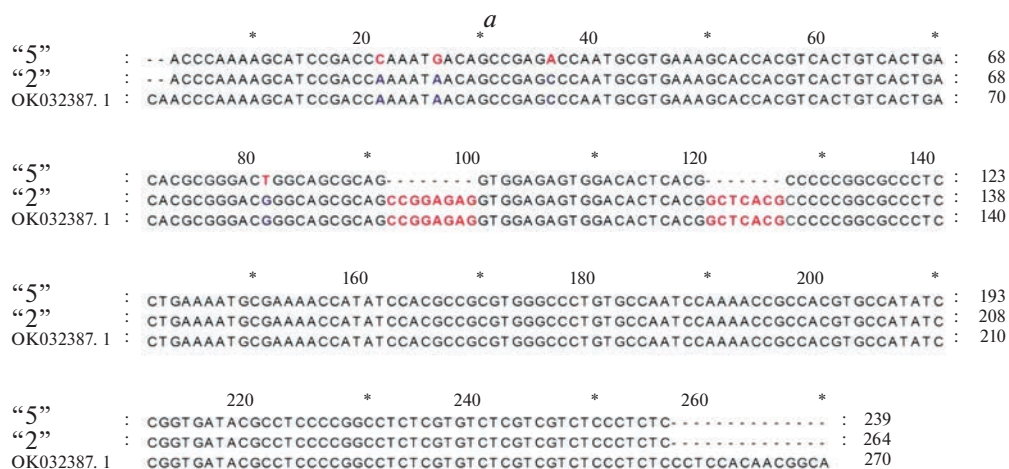


Рис. 2. *a* – сравнение последовательностей аллеля “2” (GeneID: OK032387.1) и нового аллеля “5” 5'-UTR гена *LcyE*; красным выделены моноклеотидные полиморфизмы и делеции. *б* – профиль экспрессии гена *LcyE* в проростках линий кукурузы 6097, 5580-1, 5272-6 (аллель “5”), 5677 и 6709 (аллель “2”); буквами над столбиками указаны достоверные различия ($P < 0.01$) в уровне экспрессии *LcyE* между отдельными органами внутри одного вида. *в* – регуляторные мотивы в последовательности аллеля “2” и нового аллеля “5” 5'-UTR гена *LcyE*; красной рамкой выделены области аллеля “2”, делетированные в последовательности аллеля “5”.

аллелем “5”, где экспрессия носит следовый характер (рис. 2,б). Таким образом, наблюдается прямая зависимость между присутствием аллеля “5” и снижением экспрессии гена.

Для ранее описанных четырех типов полиморфизмов была показана ассоциация с 58% имеющимися вариациями подавления синтеза каротиноидов ветви β - ϵ [1, 11]. Можно предположить, что описанный нами полиморфизм аллеля “5” (четыре SNPs и две 7/8-пн делеции в области 5'-UTR) может быть связан с частью из оставшихся 42% вариаций.

Можно предположить, что уровень экспрессии гена *LcyE* в листьях коррелирует с синтезом каротиноидов/провитамина А не только в листьях, но и в зернах кукурузы. Проведенный сравнительный поиск цис-регуляторных элементов в последовательности аллелей “2” и “5” обнаружил, что два аллеля различаются сайтами связывания с транскрипционными факторами (ТФ) (рис. 2,в). Так, в сравнении с аллелем “2”, у аллеля “5” отсутствует А-бокс (сайт связывания с ТФ семейства bZIP) и присутствует элемент CATTG (сайт связывания с ТФ семейства MYC). Оба семейства ТФ вовлечены в ответ растений на стресс. Помимо этого, bZIP-белки также участвуют в регуляции экспрессии генов, связанной с возрастом растения [26], а MYC-белки связаны с регуляцией генов фотоморфогенеза [27]. Если говорить о выявленных мотивах в контексте экспрессии *LcyE* в зернах, то регуляция генов может быть ассоциирована, скорее, с возрастными процессами, чем с чувствительностью к световым сигналам (зерна в початке полностью защищены от освещения). Это является вероятным косвенным свидетельством стимулирующего эффекта аллеля “2” по отношению к уровню транскрипции гена *LcyE* в сравнении с аллелем “5”.

Проанализированные в работе линии кукурузы характеризуются четырьмя типами окраски зерна (табл. 1). А именно: белой (предположительно, цветные каротиноиды отсутствуют); светло-желтой (за счет лютеина; преимущество ветви β - ϵ); насыщенно желтой (соотношение каротиноидов ветвей β - ϵ и β - β может быть эквивалентным); оранжевой (за счет β -каротина и зеаксантина; преимущество ветви β - β). Интересно, что среди выявленных образцов как с аллелем “2”, так и с аллелем “5” есть линии с окраской зерна всех четырех типов (табл. 1). Светло-желтая, желтая и оранжевая окраски могут объясняться различными вариациями в уровнях экспрессии генов *LcyE* (между аллелями “2” и “5”) и ликопин- β -циклазы *LcyB* (между анализируемыми генотипами), совместно определяющими силу и соотношение потоков β - ϵ и β - β , а также в экспрессии

вышестоящих генов каротиногенеза (определяющих уровень синтеза и накопление окрашенных каротиноидов). У линий с зерном белой окраски (табл. 1) можно предположить нарушение экспрессии вышестоящих генов каротиногенеза, либо эффективную утилизацию каротиноидов (к примеру, переработку ксантофиллов ветви β - β с образованием абсцизовой кислоты).

Рассматривая полученные данные, можно сделать вывод о том, что наличие в геноме кукурузы нового аллеля “5” гена *LcyE* коррелирует со снижением или подавлением экспрессии данного гена и, при стабильной активности других ферментов каротиногенеза, с окраской зерна. Доноры аллеля “5”, формирующие зерно темно-желтой или оранжевой окраски, могут быть использованы в селекции кукурузы с повышенным синтезом провитамина А в зерне.

Работа выполнена при поддержке РНФ (№ 21-16-00008) и Министерства науки и высшего образования РФ.

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

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Harjes C.E., Rocheford T.R., Bai L. et al. Natural genetic variation in lycopene epsilon cyclase tapped for maize biofortification // Science. 2008. V. 319. P. 330–333. <https://doi.org/10.1126/science.1150255>
2. Kurilich A.C., Juvik J.A. Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in *Zea mays* // J. Agric. Food Chem. 1999. V. 47. P. 1948–1955. <https://doi.org/10.1021/jf981029d>
3. O'Hare T.J., Martin I., Fanning K.J. et al. Sweetcorn colour change and consumer perception associated with increasing zeaxanthin for the amelioration of age-related macular degeneration // Acta Horticulturae. 2014. V. 1040. P. 221–226. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1040.30>
4. Yadav O.P., Hossain F., Karjagi C.G. et al. Genetic improvement of maize in India: Retrospect and prospects // Agric. Res. 2015. V. 4. № 4. P. 325–338. <https://doi.org/10.1007/s40003-015-0180-8>
5. Zunjare R.U., Chhabra R., Hossain F. et al. Molecular characterization of 5'-UTR of the lycopene epsilon cyclase (*lcyE*) gene among exotic and indigenous inbreds for its utilization in maize biofortification // 3 Biotech. 2018. V. 8. № 1. P. 75. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1100-y>

6. Cunningham F.X., Jr., Pogson B., Sun Z. et al. Functional analysis of the β and ϵ lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation // Plant Cell. 1996. V. 8. P. 1613–1626. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.9.1613>
7. Rosas-Saavedra C., Stange C. Biosynthesis of carotenoids in plants: Enzymes and color // Subcell Biochem. 2016. V. 79. P. 35–69. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39126-7_2
8. Wong J.C., Lambert R.J., Wurtzel E.T., Rocheford T.R. QTL and candidate genes phytoene synthase and zeta-carotene desaturase associated with the accumulation of carotenoids in maize // Theor. Appl. Genet. 2004. V. 108. № 2. P. 349–359. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1436-4>
9. Krinsky N.I., Johnson E.J. Carotenoid actions and their relation to health and disease // Mol. Aspects of Med. 2005. V. 26. № 6. P. 459–516. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.10.001>
10. Nagao A., Olson J.A. Enzymatic formation of 9-cis, 13-cis, and all-trans retinals from isomers of beta-carotene // Faseb J. 1994. V. 8. № 12. P. 968–973. <https://doi.org/10.1096/fasebj.8.12.8088462>
11. Babu R., Rojas N.P., Gao S. et al. Validation of the effects of molecular marker polymorphisms in *LcyE* and *CrtR1* on provitamin A concentrations for 26 tropical maize populations // Theor. Appl. Genet. 2013. V. 126. P. 389–399. <https://doi.org/10.1007/s00122-012-1987-3>
12. Baveja A., Muthusamy V., Panda K.K. et al. Development of multinutrient-rich biofortified sweet corn hybrids through genomics-assisted selection of *shrunk2*, *opaque2*, *lcyE* and *crtR1* genes // J. Appl. Genet. 2021. V. 62. № 3. P. 419–429. <https://doi.org/10.1007/s13353-021-00633-4>
13. Bai L., Kim E.H., DellaPenna D., Brutnell T.P. Novel lycopene epsilon cyclase activities in maize revealed through perturbation of carotenoid biosynthesis // Plant J. 2009. V. 59. № 4. P. 588–599. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2009.03899.x>
14. Yu B., Lydiate D.J., Young L.W. et al. Enhancing the carotenoid content of *Brassica napus* seeds by downregulating lycopene epsilon cyclase // Transgenic Res. 2008. V. 17. № 4. P. 573–585. <https://doi.org/10.1007/s11248-007-9131-x>
15. Diretto G., Tavazza R., Welsch R. et al. Metabolic engineering of potato tuber carotenoids through tuber-specific silencing of lycopene epsilon cyclase // BMC Plant Biol. 2006. V. 6. P. 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-6-6>
16. Pogson B.J., Rissler H.M. Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis and photoprotection // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 2000. V. 355. № 1402. P. 1395–1403. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0701>
17. Richaud D., Stange C., Gadaleta A. et al. Identification of lycopene epsilon cyclase (*lcyE*) gene mutants to potentially increase β -carotene content in durum wheat (*Triticum turgidum* L. ssp. *durum*) through TILLING // PLoS One. 2018. V. 13. № 12: e0208948. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208948>
18. Yan J., Kandianis B.C., Harjes E.C. et al. Rare genetic variation at *Zea mays crtR1* increases beta carotene in maize grain // Nat. Genet. 2010. V. 42. P. 322–327. <https://doi.org/10.1038/ng.551>
19. Liu L., Jeffers D., Zhang Y. et al. Introgression of the *crtR1* gene into quality protein maize inbred lines using molecular markers // Mol. Breed. 2015. V. 35. № 8: 154. <https://doi.org/10.1007/s11032-015-0349-7>
20. Muthusamy V., Hossain F., Thirunavukkarasu N. et al. Development of β -carotene rich maize hybrids through marker-assisted introgression of β -carotene hydroxylase allele // PLoS One. 2014. V. 9. № 12. P. e11583. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113583>
21. Дьяченко Е.А., Слугина М.А. Внутривидовой полиморфизм гена сахарозсинтазы *Sus1* у образцов *Pisum sativum* L. // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2018. Т. 22. № 1. С. 108–114. <https://doi.org/10.18699/VJ18.338>
22. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets // Mol. Biol. Evol. 2016. V. 33. № 7. P. 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
23. Lescot M. PlantCARE, a database of plant cis – acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences // Nucl. Ac. Res. 2002. V. 30. P. 325–327. <https://doi.org/10.1093/nar/30.1.325>
24. Li F., Vallabhaneni R., Wurtzel E.T. PSY3, a new member of the phytoene synthase gene family conserved in the Poaceae and regulator of abiotic stress – induced root carotenogenesis // Plant Physiol. 2008. V. 146. P. 1333–1345. <https://doi.org/10.1104/pp.107.111120>
25. Dibari B., Murat F., Chosson A. et al. Deciphering the genomic structure, function and evolution of carotenogenesis related phytoene synthases in grasses // BMC Genomics. 2012. V. 13. P. 221. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-221>
26. Vatov E., Ludewig U., Zentgraf U. Disparate dynamics of gene body and cis-regulatory element evolution illustrated for the senescence-associated cysteine protease gene *SAG12* of plants // Plants (Basel). 2021. V. 10. № 7: 1380. <https://doi.org/10.3390/plants10071380>
27. Bai J.F., Wang Y.K., Guo L.P. et al. Genomic identification and characterization of MYC family genes in wheat (*Triticum aestivum* L.) // BMC Genomics. 2019. V. 20. № 1. Article 1032. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6373-y>

A New 5'-UTR *LcyE* allele Correlates with Increased Expression of the Lycopene- ϵ -Cyclase Gene Determining the Flow of the β - ϵ Branch of the Carotenoid Biosynthesis Pathway in Maize

D. H. Arkhestova^{a, b}, G. I. Efremov^{a, *}, S. P. Appaev^b, E. Z. Kochieva^a, and A. V. Shchennikova^a

^a*Institute of Bioengineering, Federal Research Center Fundamentals of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

^b*Institute of Agriculture – a Branch of the Kabardino-Balkarian Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Nalchik, 360004 Russia*

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

The color of *Zea mays* L. kernel is determined by the content and composition of carotenoids, including provitamin A, which is a product of the β - β (β -carotene, β -cryptoxanthin) and β - ϵ (α -carotene) branches of carotenogenesis. The ratio of the fluxes of the branches depends on the activity of the lycopene- ϵ -cyclase *LcyE*, which determines the β - ϵ branch. In this work, we analyzed allelic variants of the *LcyE* gene, which are potentially effective for increasing the biosynthesis of β -carotene, in 20 maize inbred lines of domestic selection, which differ in grain color. The 5'-UTR region of the *LcyE* gene were amplified and sequenced. Fragment analysis showed the presence of allele "2" in four lines and a new allele "5" in 16 lines. The polymorphism of the new allele "5" was characterized – four mononucleotide polymorphisms and two deletions. The comparison of *cis*-regulatory elements in the analyzed region of the 5'-UTR of alleles "2" and "5" revealed a difference in binding sites with transcription factors. Expression of the *LcyE* gene was determined in the leaves of two lines with the allele "2" and three lines with the allele "5". A direct relationship was shown between the presence of the allele "5" and a decrease in gene expression: the level of gene transcription in the case of the allele "2" was 10–15 times higher than in the case of the allele "5". It has been suggested that the presence of allele "5" of the *LcyE* gene in the maize genome correlates with a decrease or suppression of the *LcyE* expression and, with stable activity of other carotenogenesis enzymes, with grain color. The use of allele "5" donors in combination with the known dark yellow or orange color of the grain can be used in the breeding of maize with increased synthesis of provitamin A in the grain.

Keywords: *Zea mays* L., maize inbred lines, carotenoid biosynthesis, provitamin A, lycopene- ϵ -cyclase, gene expression, 5'-UTR-polymorphism.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ И РОДСТВЕННЫЕ СВЯЗИ *Cottus kolyomensis* Sideleva et Goto, 2012 (Cottidae)

© 2023 г. О. А. Радченко^{1, *}, И. Н. Морева^{1, 2}, А. В. Петровская¹

¹Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Магадан, 685000 Россия

²Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского Дальневосточного
отделения Российской академии наук, Владивосток, 690041 Россия

*e-mail: mradchenko@mail.ru

Поступила в редакцию 11.05.2022 г.

После доработки 16.06.2022 г.

Принята к публикации 07.07.2022 г.

Впервые проведено кариологическое и молекулярно-генетическое (гены *COI*, цитохрома *b*, *16S* рРНК) изучение пресноводного вида рыб *Cottus kolyomensis*, описанного недавно из рек Дукча и Колыма на северо-востоке Азии. Определен комплекс кариологических и молекулярно-генетических маркерных признаков, позволяющих идентифицировать вид. Обнаружены генетические различия популяций *C. kolyomensis*, населяющих водоемы бассейнов р. Колымы и северной части Охотского моря, на основании которых вид разделяется на группы в соответствии с местом обитания. Подтверждено существование в пределах рода *Cottus* отдельной группы “*Cottus poecilopus*”, в которую входят таксоны видового ранга, в том числе и *C. kolyomensis*.

Ключевые слова: рогатковые рыбы, кариотип, маркерные хромосомы, митохондриальная ДНК (мтДНК), гены *COI*, цитохрома *b*, *16S* рРНК, молекулярная филогения, перичентрические инверсии.

DOI: 10.31857/S0016675823030104, **EDN:** IQJEIM

Арктически-бореальный подкаменщик *Cottus kolyomensis* Sideleva et Goto, 2012 описан из рек Колыма и Дукча на северо-востоке Азии [1]. Пресноводный, озерно-речной вид предпочитает участки рек с быстрым течением и каменисто-галечным грунтом, ведет уединенный образ жизни, прячется под камнями. Биология и распространение вида слабо изучены, границы ареала не известны.

История исследования *C. kolyomensis* началась задолго до его описания, когда в бассейнах рек Чаун и Колыма, а также в водоемах северного побережья Охотского моря была обнаружена новая форма подкаменщиков, обозначенная как *Cottus* sp. [2]. Подробный сравнительный морфологический анализ не позволил идентифицировать нового подкаменщика ни с одним из известных видов рода *Cottus*, но позволил определить его родство с видами группы “*Cottus poecilopus*”. Загадочный *Cottus* sp. получил видовой статус лишь спустя 30 лет после его находки [1].

Подкаменщиков группы “*Cottus poecilopus*” объединяет и одновременно отличает от других видов рода *Cottus* ряд морфологических признаков: длинный брюшной плавник, доходящий до анального отверстия, с укороченным внутренним лучом и множеством темных поперечных полос

(обычно 7–15), костные шипики под грудным плавником [1]. Колымский подкаменщик отличается от видов группы “*Cottus poecilopus*” комбинацией морфологических признаков, в их числе: сильно редуцированный внутренний луч брюшного плавника, зубы на небных костях, широкое межглазничное пространство, туловишный сейсмический канал неполный, пятая пора в предкрышечно-нижнечелюстном канале парная [1].

В группу “*Cottus poecilopus*” включают семь видов, обитающих в крупных речных системах: *C. poecilopus* Heckel, 1837 из рек Центральной Европы, *C. altaicus* Kaschenko, 1899 из бассейна р. Иртыш, *C. szanaga* Dybowski, 1869 из бассейна р. Амур, *C. kuznetzovi* Berg, 1903 из бассейна р. Лена, *C. volki* Таранец, 1933 из рек Приморья, *C. koreanus* Fujii, Choi et Yabe, 2005 из рек Кореи, *C. kolyomensis* из бассейна р. Колыма и водоемов северного побережья Охотского моря [1, 3–5]. Другая точка зрения — существование широко распространенного политипического вида *Cottus poecilopus*, географически изолированные группы которого рассматриваются в ранге подвидов [6]. В последнем случае *C. kolyomensis* считается подвидом — пестроногим колымским подкаменщиком *Cottus poecilopus kolyomensis* [7].

Исследованию *C. kolyomensis* посвящены лишь единичные работы по морфологии [1, 2] и молекулярно-генетическому анализу с использованием контрольного региона мтДНК [8], информативность которого может быть ограничена в связи с высоким уровнем вариабельности. Кариотип колымского подкаменщика не исследован. Очевидно, что дискуссионность таксономического статуса и недостаточная изученность *C. kolyomensis* требуют пристального внимания и развития исследований, в том числе с помощью молекулярно-генетических и кариологических методов. Эффективность их совместного использования подтверждена результатами изучения генетической изменчивости и филогенетических отношений в других таксонах семейства Cottidae [9].

В настоящей работе впервые проведено описание цитотипов и их сравнительное изучение, а также анализ изменчивости генов *COI*, цитохрома *b*, *16S* рРНК мтДНК *C. kolyomensis*, обитающего в реках и озерах Охотско-Колымского края на северо-востоке Азии. В анализ включены экземпляры из типового местообитания колымского подкаменщика — р. Дукча на северном побережье Охотского моря. Полученные цитогенетические и молекулярно-генетические данные позволяют оценить географическую изменчивость *C. kolyomensis* из водоемов бассейна Охотского моря и р. Колымы, определить генетическую дифференциацию вида в пределах рода *Cottus* и его взаимосвязь с видами группы “*Cottus poecilopus*”.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объем исследованного материала приведен в табл. 1. Рыбы выловлены с помощью сачков (реки Дукча и Кулькуты, бассейн Охотского моря), ловушек (озера Момонтай и Урультун, бассейн р. Колымы), сетей (озера Чистое и Глухое, бассейн Охотского моря). Видовая принадлежность экземпляров определена по морфологическим признакам [10]. Изученные образцы хранятся в коллекции лаборатории ихтиологии Института биологических проблем Севера, Магадан, Россия (номера ваучеров приведены в табл. 1).

Молекулярно-генетический анализ

Проведен анализ изменчивости нуклеотидных последовательностей генов *COI*, цитохрома *b* и *16S* рРНК мтДНК 25 экз. *C. kolyomensis* и 2 экз. *C. cognatus* Richardson, 1836. Для сравнительного молекулярно-генетического анализа использованы данные из GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) по другим 12 видам рода *Cottus*. Виды *Mesocottus haiteji* (Dybowski, 1869) и *Trachidermus fasciatus* Heckel, 1837 (подсемейство Cottinae, семейство Cottidae) использованы как внешняя группа.

Геномная ДНК выделена из мышечной ткани по стандартной методике, включающей лизис ткани 1% SDS в присутствии протеиназы К (0.2 мг/мл) и депротеинизацию фенолом [11]. Условия амплификации и секвенирования ДНК, последовательности олигонуклеотидных праймеров использованы из предшествующей работы: *COI* — F-33 и R-1421; цитохром *b* — L14795 и H15844; *16S* рРНК — L2510 и H3080 [12]. Секвенирование ДНК выполнено на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) в лаборатории генетики Института биологических проблем Севера ДВО РАН (Магадан, Россия).

Попарные генетические дистанции рассчитаны для объединенных последовательностей генов *COI*, цитохрома *b*, *16S* рРНК мтДНК в программе MEGA X [13] методом максимального правдоподобия (ML) с учетом гетерогенности скорости нуклеотидных замен (гамма-распределение G). Оптимальные модели нуклеотидных замен выбраны с использованием информационного критерия BIC (Bayesian Information Criterion) в программе MEGA X. Филогенетический анализ выполнен методом байесовского анализа в программе MrBayes v3.2.1 [14]. Для контроля динамики байесовского анализа использована программа Tracer v1.7 [15]. Установки для анализа MCMC: 4 цепи, 1000000 генераций, отбор деревьев через каждые 100 генераций. Значения вероятности достигли плато в течение 10000–15000 генераций. Значения логарифмической вероятности увеличились с менее чем –7542,730 до примерно –4213,251 в первых 5000 генераций, затем примерно до –3678,552 после 500000 генераций. Из 10001 дерева первые 1001 с нестабильными параметрами моделей нуклеотидных замен были отброшены, а остальные использовались для получения консенсусных деревьев и апостериорных вероятностей их ветвления. Узлы ветвления с оценками вероятности $\geq 95\%$ приняты как достоверные [16]. Для определения взаимосвязей гаплотипов *C. kolyomensis* построено UPGMA дерево с двухпараметрической моделью Кимуры и оценкой достоверности топологии в 10000 повторных псевдослучайных выборок бутстрэп-анализа (MEGA X); узлы ветвления с бутстрэпами $\geq 70\%$ приняты как достоверные [16].

Кариологический анализ

Изучены кариотипы четырех самок, трех самцов *C. kolyomensis*. Хромосомные препараты приготовлены из суспензии клеток переднего отдела почки рыб методом воздушного высушивания [17]. Для первичного анализа кариотипа хромосомы окрашивали 4%-ным раствором красителя Гимза (Giemsa). Хромосомные препараты исследовали под микроскопом Leica. Лучшие метафазные пластинки были сфотографированы с помощью камеры AxioCam HR CCD с программным обеспе-

Таблица 1. Данные об изученных экземплярах *Cottus kolyomensis*, видов рода *Cottus* и внешней группы (* – образцы изучены кариологически)

Вид (ваучерный номер образца)	Район сбора	Номер в GenBank		
		<i>COI</i>	<i>16S</i> рРНК	ген цитохрома <i>b</i>
<i>Cottus kolyomensis</i> (2222)	Бассейн р. Колыма, оз. Момонтай	ON358200	ON358132	ON364525
<i>C. kolyomensis</i> (2060)	»	ON358201	ON358133	ON364526
<i>C. kolyomensis</i> (2256)	»	ON358206	ON358138	ON364531
<i>C. kolyomensis</i> (2257)	»	ON358207	ON358139	ON364532
<i>C. kolyomensis</i> (2268)	»	ON358208	ON358140	ON364533
<i>C. kolyomensis</i> (2279)	»	ON358209	ON358141	ON364534
<i>C. kolyomensis</i> (2322)	»	ON358222	ON358154	ON364547
<i>C. kolyomensis</i> (2320)	Бассейн р. Колыма, оз. Урультун	ON358220	ON358152	ON364545
<i>C. kolyomensis</i> (2321)	»	ON358221	ON358153	ON364546
<i>C. kolyomensis</i> (2250)	Бассейн Охотского моря, бухта Гертнера, р. Дукча	ON358202	ON358134	ON364527
<i>C. kolyomensis</i> (2248)	»	ON358203	ON358135	ON364528
<i>C. kolyomensis</i> (2238)	»	ON358204	ON358136	ON364529
<i>C. kolyomensis</i> (2239)	»	ON358205	ON358137	ON364530
<i>C. kolyomensis</i> (2315)*	»	ON358216	ON358148	ON364541
<i>C. kolyomensis</i> (2316)*	»	ON358217	ON358149	ON364542
<i>C. kolyomensis</i> (2318)*	»	ON358218	ON358150	ON364543
<i>C. kolyomensis</i> (2319)*	»	ON358219	ON358151	ON364544
<i>C. kolyomensis</i> (2335)	Бассейн Охотского моря, бассейн р. Ола, оз. Чистое	ON358223	ON358155	ON364548
<i>C. kolyomensis</i> (2324)	»	ON358224	ON358156	ON364549
<i>C. kolyomensis</i> (2314)	Бассейн Охотского моря, Амахтонский залив, оз. Глухое	ON358215	ON358147	ON364540
<i>C. kolyomensis</i> (2285)*	Бассейн Охотского моря, залив Одян, р. Кулькуты	ON358210	ON358142	ON364535
<i>C. kolyomensis</i> (2286)*	»	ON358211	ON358143	ON364536
<i>C. kolyomensis</i> (2287)*	»	ON358212	ON358144	ON364537
<i>C. kolyomensis</i> (2288)	»	ON358213	ON358145	ON364538
<i>C. kolyomensis</i> (2289)	»	ON358214	ON358146	ON364539
<i>C. cognatus</i> (2290)	Чукотка, термальные источники р. Гильмимливеем	ON358225	ON358157	ON364550
<i>C. cognatus</i> (2291)	»	ON358226	ON358158	ON364551
<i>C. rhenanus</i>	Германия, Северный Рейн-Вестфалия	MF326941		
<i>C. perifretum</i>	Бельгия, Фландрия	MF326940		
<i>C. asper</i>	США, Калифорния, Гумбольдт, р. Редвуд-Крик	MF326939		
<i>C. dzungaricus</i>	Китай, р. Иртыш	MH638324		
<i>C. hangiongensis</i>	Корейский п-ов	NC014851		
<i>C. koreanus</i>	Корейский п-ов	EU332750		
<i>C. poecilopus</i>	Китай, Хэйлунцзян, р. Амур	MW448544		
<i>C. szanaga</i>	Приморский край, р. Соболевка	NC032039		
<i>C. czerskii</i>	Китай, Хэйлунцзян, Ичунь	NC025242		
<i>C. volki</i>	Приморский край, р. Алексеевка	NC035001		
<i>C. cognatus</i>	США, Висконсин, оз. Верхнее	MW856888		
<i>C. amblystomopsis</i>	Сахалин, р. Таранай	NC035002		
<i>C. bairdii</i>	США, Пенсильвания, р. Аллегейни	MW856840		
<i>Mesocottus haitej</i>	Приморский край, р. Арму	KF170218		
<i>Trachidermus fasciatus</i>	Нет данных	JX017305		

чением AXIOVISION (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия). Микроскопию и визуализацию проводили в Дальневосточном центре электронной и световой микроскопии Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского (ННЦМБ) ДВО РАН, Владивосток.

Использовали общепринятую в цитогенетических исследованиях классификацию хромосом [18]. Равноплечие метацентрические (М) и неравноплечие субметацентрические (СМ) хромосомы относили к двуплечим, субтелоцентрические (СТ) с очень коротким вторым плечом и акроцентрические (А) с невидимым вторым плечом — к одноплечим хромосомам. Для сравнительного анализа привлечены данные о кариотипах 10 представителей рода *Cottus* [19–27]. Субтелоцентрики видов *C. koreanus* и *C. hangiongensis*, учитывая указанное число хромосом и число хромосомных плеч, трактуются авторами настоящей публикации как двуплечие хромосомы. Одноплечие хромосомы в кариограммах этих видов обозначены как телоцентрики (Т) [26].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Молекулярно-генетический анализ

Нуклеотидные последовательности участков генов *COI*, цитохрома *b* и *16S* рРНК размещены в GenBank/NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), их регистрационные номера указаны в табл. 1.

Обнаружены следующие показатели генетической изменчивости видов рода *Cottus*. Для гена *COI* (939 пар нуклеотидов, пн) идентифицировано 264 нуклеотидные замены и 219 полиморфных сайтов, 164 (17.5%) замены филогенетически информативные. Из 313 кодируемых аминокислотных остатков два переменных. Для гена цитохрома *b* (840 пн) идентифицировано 274 нуклеотидные замены и 227 полиморфных сайтов, 161 (19.1%) замена филогенетически информативная. Из 280 кодируемых аминокислотных остатков 21 переменный. Для гена *16S* рРНК (612 пн) идентифицировано 58 нуклеотидных замен и 51 полиморфный сайт, 34 (5.6%) замены филогенетически информативные.

Показатели генетической изменчивости *C. kolymensis* следующие. Для гена *COI* обнаружено четыре нуклеотидных замены и четыре филогенетически информативных сайта. Для гена цитохрома *b* обнаружено четыре нуклеотидных замены и четыре филогенетически информативных сайта; одна замена аминокислотных остатков. Для гена *16S* рРНК обнаружено две нуклеотидные замены и два филогенетически информативных сайта. У колымского подкаменщика выявлено четыре гаплотипа.

Во всех исследованных генах обнаружены мутации, маркирующие *C. kolymensis* и отличающие его от других видов рода *Cottus*: 7, 3 и 2 замены

нуклеотидов для генов *COI*, цитохрома *b* и *16S* рРНК. В соответствии с данными табл. 2 значения ML-дистанций между мтДНК *C. kolymensis* и внешней группы варьируют от 10.79% (*C. kolymensis*/*Mesocottus haitej*) до 14.27% (*C. kolymensis*/*Trachidermus fasciatus*). Между *C. kolymensis* и другими видами рода *Cottus* минимальное значение составило 4.64% (с *C. czerskii*), максимальное — 9.56% (с *C. hangiongensis*). Генетические дистанции между *C. kolymensis* и видами группы “*Cottus poecilopus*” (*C. szanaga*, *C. poecilopus*, *C. volki*, исключая *C. koreanus*) варьируют от 4.73 до 6.27%.

По данным об объединенных последовательностях мтДНК *C. kolymensis* реконструировано UPGMA-дерево (рис. 1), которое включает три кластера: Kol (экземпляры из озер бассейна р. Колыма), Okh1 (экземпляры из бассейна Охотского моря — р. Дукча, озер Чистое и Глухое), Okh2 (экземпляры из бассейна Охотского моря — р. Кульки). Все узлы ветвления поддержаны достоверными значениями бутстрэп-оценок ($\geq 70\%$).

По данным об объединенных последовательностях мтДНК видов рода *Cottus* реконструировано байесовское филогенетическое дерево (рис. 2). В основании дерева находятся ДНК видов внешней группы. Виды рода *Cottus* разделяются на три кластера: А (*C. amblystomopsis* Schmidt, 1904, *C. hangiongensis* Mori, 1930, *C. koreanus*), В (*C. asper* Richardson, 1836, *C. dzungaricus* Kottelat, 2006, *C. perifretum* Freyhof, Kottelat et Nolte, 2005, *C. rhenanus* Freyhof, Kottelat et Nolte, 2005, *C. bairdii* Girard, 1850, *C. cognatus*), С (*C. volki*, *C. poecilopus*, *C. czerskii* Berg, 1913, *C. szanaga*, *C. kolymensis*). Оценки апостериорной вероятности ($PP \geq 0.95$) подтверждают достоверность ассоциаций типов ДНК.

Кариологический анализ

На основании анализа 350 рутинно окрашенных метафазных пластинок установлены два цитотипа вида *C. kolymensis*.

Цитотип I — $2n = 48$, NF = 58 (рис. 3,а), обнаружен у четырех (три самки, один самец) экземпляров. В него входили двуплечие хромосомы: два средних метацентрика (пара 1); четыре крупных (пары 2, 3), два средних (пара 4) и два мелких (пара 5) субметацентрика. Одноплечие хромосомы в нем представлены тридцатью субтелоцентриками (пары 6–20) и 8 акроцентриками (пары 21–24).

Цитотип II — $2n = 48$, NF = 56 (рис. 3,б), выявлен у трех (два самца, одна самка) экземпляров. Он включал два средних метацентрика (пара 1), два крупных (пара 2), два средних (пара 3) и два мелких (пара 4) субметацентрика, тридцать два субтелоцентрика (пары 5–20) и восемь акроцентрических хромосом (пары 21–24).

Метацентрики (рис. 3,а, б: пара 1), субметацентрики (рис. 3,а: пары 2, 3, 4, 5; б: пары 2, 3, 4),

Таблица 2. Значения ML-дистанций (в %) по данным о нуклеотидных последовательностях участков генов *COI*, цитохрома *b*, *16S* рРНК видов рода *Cottus* и внешней группы

Вид (ваучерный номер, номер в GenBank)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1. <i>Cottus kotymensis</i> (2222)																			
2. <i>C. kotymensis</i> (2250)	0.29																		
3. <i>C. kotymensis</i> (2286)	0.42	0.13																	
4. <i>C. szanaga</i> (NC032039)	4.73	4.78	4.82																
5. <i>C. czerskii</i> (NC025242)	4.69	4.64	4.69	1.40															
6. <i>C. poecilopus</i> (MW448544)	5.50	5.36	5.50	3.90	3.86														
7. <i>C. volki</i> (NC035001)	6.27	6.13	6.18	6.97	6.83	6.97													
8. <i>C. periphetum</i> (MF326940)	7.35	7.44	7.59	7.48	7.28	7.54	8.02												
9. <i>C. dzungaricus</i> (MH638324)	7.39	7.49	7.64	7.48	7.24	7.54	7.69	1.57											
10. <i>C. cognatus</i> (2291)	7.61	7.76	7.81	7.46	7.08	7.75	7.57	4.44	4.49										
11. <i>C. cognatus</i> (2290)	7.66	7.81	7.86	7.51	7.13	7.80	7.62	4.49	4.54	0.13									
12. <i>C. cognatus</i> (MW856888)	8.00	8.14	8.19	7.60	7.22	8.04	7.57	4.81	4.72	3.05	3.14								
13. <i>C. asper</i> (MF326939)	7.38	7.34	7.48	7.61	7.14	7.57	7.25	5.55	5.33	5.73	5.78	6.24							
14. <i>C. rhenanus</i> (MF326941)	7.58	7.68	7.82	7.62	7.28	7.49	7.73	1.27	1.57	4.35	4.40	5.04	5.55						
15. <i>C. bairdii</i> (MW856840)	8.24	8.38	8.44	7.70	7.22	8.09	7.96	4.86	4.77	2.97	3.06	1.06	6.33	4.90					
16. <i>C. koreanus</i> (EU332750)	8.27	8.31	8.36	8.75	8.69	9.33	8.63	8.59	8.63	8.04	8.09	8.23	7.86	8.58	8.43				
17. <i>C. amblystomopsis</i> (NC035002)	9.03	9.12	9.08	9.22	9.23	9.31	8.88	9.36	9.46	9.25	9.30	10.14	8.72	9.40	10.00	8.49			
18. <i>C. hangjongsensis</i> (NC014851)	9.46	9.51	9.56	10.04	9.85	9.90	9.37	9.56	9.40	9.05	9.15	9.48	8.84	9.30	9.59	6.57	9.90		
19. <i>Mesocottus haitei</i> (KF170218)	10.79	10.79	10.94	11.24	11.24	11.28	10.89	10.99	11.01	11.48	11.54	11.75	10.74	10.79	11.70	11.45	12.38	11.86	
20. <i>Trachidermus fasciatus</i> (JX017305)	14.27	14.06	14.12	14.23	14.67	14.33	14.31	15.07	15.00	14.63	14.69	15.18	14.18	14.56	15.19	15.52	14.67	15.55	15.38

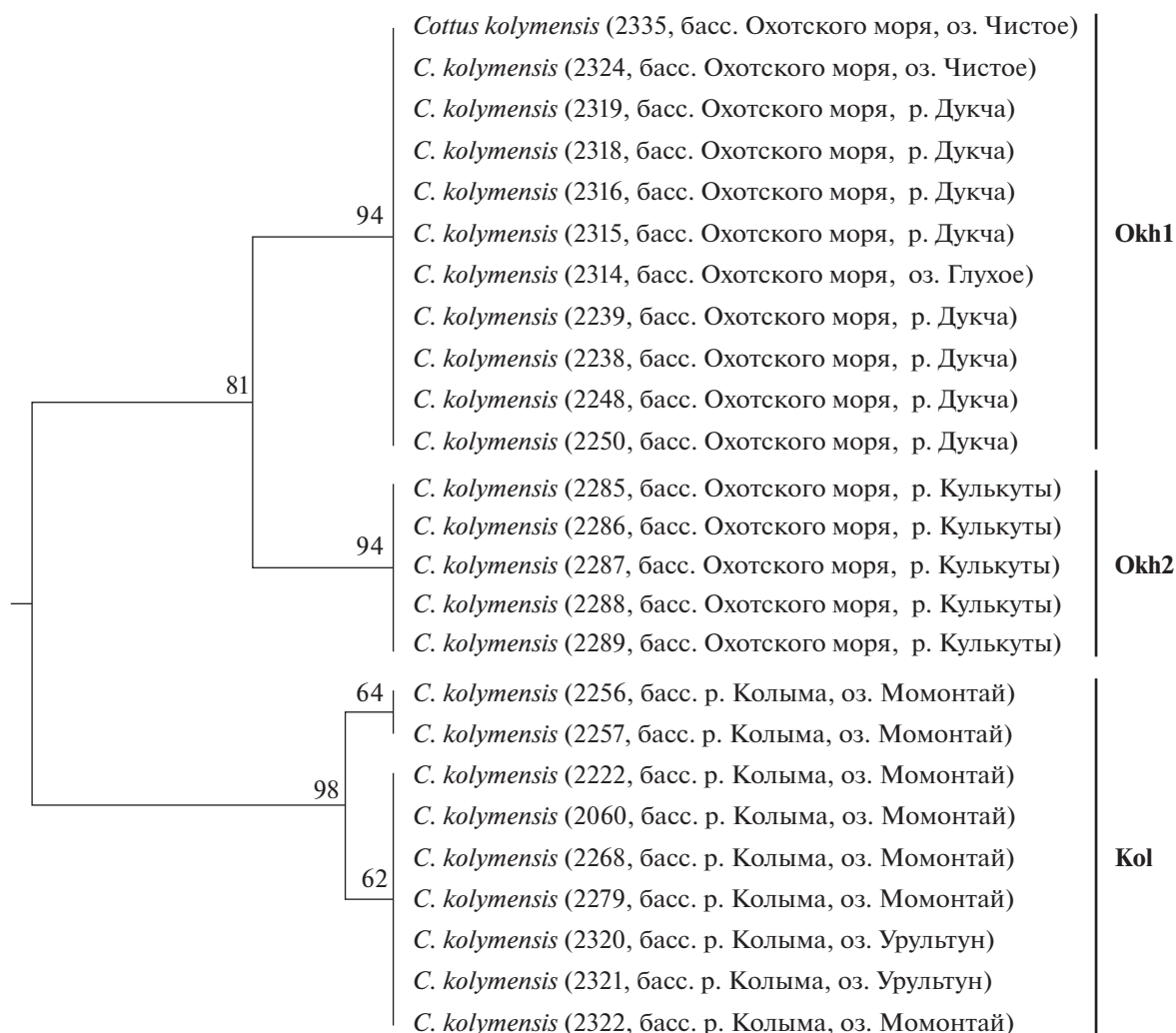


Рис. 1. UPGMA-дерево *Cottus kolymentis* по данным об объединенных последовательностях генов *COI*, цитохрома *b* и *16S* рРНК митохондриального генома. Числа в основаниях кластеров – бутстрэп-поддержки (в % от 10 000 реплик). В скобках приведены ваучерные номера и район сбора экземпляров вида. Okh1 и Okh2 Kol – внутривидовые группы.

крупные субтелоцентрики (рис. 3, а: пары 6, 7; б: пары 5, 6) и акроцентрики (рис. 3, а, б: пара 21), всегда хорошо идентифицируемые во всех метафазных пластинках, рассматриваются нами как маркерные для обоих обнаруженных цитотипов. Изменчивость по числу хромосом не установлена, различий между кариотипами самцов и самок вида по $2n$ и NF не выявлено.

ОБСУЖДЕНИЕ

Внутривидовая изменчивость *Cottus kolymentis*

В настоящей работе исследована выборка *C. kolymentis*, которая включает рыб из шести популяций, населяющих водоемы бассейна северной части Охотского моря и бассейна р. Колымы. Результаты молекулярно-генетического анализа свидетельствуют о генетической неоднородно-

сти вида. Наблюдаемая изменчивость обусловлена различиями между экземплярами колымского подкаменщика, выловленными как в относительно близких (озера и реки охотоморского бассейна), так и в удаленных (охотоморский и колымский бассейны) частях ареала. В нуклеотидных последовательностях генов *COI*, цитохрома *b* и *16S* рРНК обнаружены замены, объединяющие *C. kolymentis* в три группы – колымскую Kol (озера Момотай и Урультун, бассейн р. Колыма), охотоморскую Okh1 (озера Чистое и Глухое, р. Дукча, бассейн Охотского моря) и охотоморскую Okh2 (р. Кулькуты, бассейн Охотского моря). В одном из самых эволюционно-консервативных в митохондриальном геноме гене *16S* рРНК, изменчивость которого может свидетельствовать о давней дивергенции, установлены 2 нуклеотидные замены, маркирующие группы Kol и Okh.

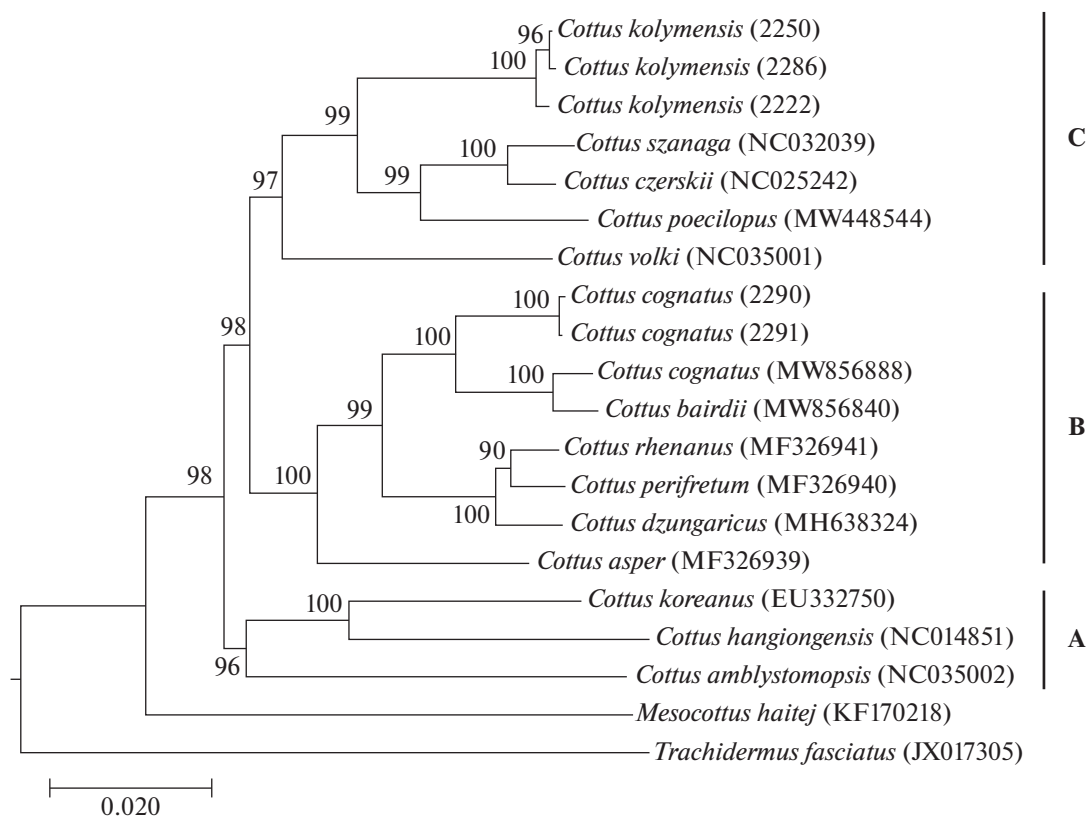


Рис. 2. Байесовское дерево видов рода *Cottus* по данным об объединенных последовательностях генов *COI*, цитохрома *b* и *16S* рРНК митохондриального генома. Числа в основаниях кластеров — оценки апостериорной вероятности (в %). Рядом с названиями видов приведены ваучерные номера (в скобках) и номера в GenBank. А, В и С — филогенетические группы.

В целом число обнаруженных у *C. kolymensis* вариабельных сайтов составило 0.4, 0.5 и 0.3% для генов *COI*, цитохрома *b* и *16S* рРНК соответственно. Такие значения являются очень низкими в сравнении с уровнями межвидовой дивергенции в семействе Cottidae, установленными, например, для нуклеотидных последовательностей тех же участков мтДНК видов рода *Gymnancistrus* (7.7, 8.4 и 11.9% для генов *COI*, *12S*–*16S* рРНК и цитохрома *b*) [28].

Ранее на основе сравнительного анализа разных участков мтДНК были предложены пороговые значения внутривидовых и межвидовых генетических дистанций для представителей рода *Cottus* [29, 30]. Например, для участка гена *COI* таким критерием являются не более 1% различий между популяциями одного вида и 5–8% различий между видами. Полученные в настоящей работе ML-дистанции между последовательностями гена *COI* групп колымского подкаменщика не превышают внутривидовых различий — 0.11% (Okh1/Okh2), 0.32% (Okh1/Kol), 0.43% (Okh2/Kol). Анализ объединенных нуклеотидных последовательностей генов *COI*, цитохрома *b*, *16S* рРНК также показывает невысокие различия групп *C. kolymensis* из

разных частей ареала — 0.13% (Okh1/Okh2), 0.28% (Okh1/Kol), 0.41% (Okh2/Kol).

Топология UPGMA-дерева (рис. 1) подтверждает подразделенность колымского подкаменщика в соответствии с географической приуроченностью к определенному месту обитания, с одной стороны, и невысокий уровень генетических различий, с другой. В структуре дерева выделяются три кластера: Kol (озера Момонтай и Урультун, бассейн р. Колыма), Okh1 (озера Чистое и Глухое, р. Дукча, бассейн Охотского моря) и Okh2 (р. Кулькуты, бассейн Охотского моря).

Данные кариологического анализа подтверждают внутривидовую неоднородность *C. kolymensis* и разделение его на группы. Колымский подкаменщик в отличие от большинства исследованных видов, хромосомные наборы которых стабильны, обладает изменчивостью числа хромосомных плеч (рис. 3; табл. 3). Сходные различия хромосомных наборов присутствуют у экземпляров *C. gobio* и *C. hangiongensis* из разных участков ареала [20, 22, 25, 26]. В соответствии с топологией UPGMA-дерева (рис. 1) наблюдаемая изменчивость обусловлена различиями между экземплярами вида из кластеров Okh1 (р. Дукча — цитотип I) и Okh2 (цитотип II).

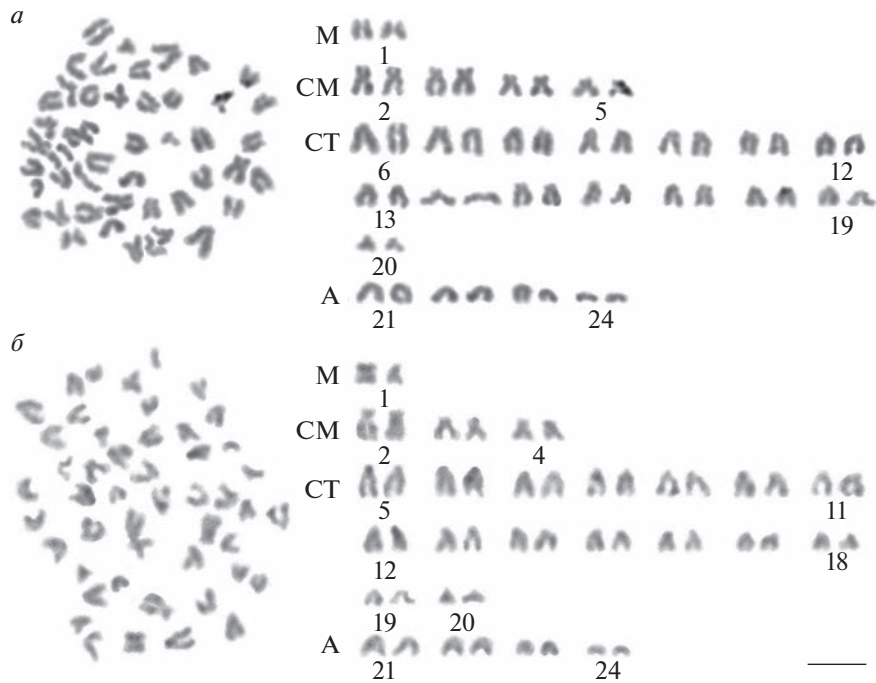


Рис. 3. Метафазные пластинки и кариогаммы *C. kolyomensis* из: *a* – р. Дукча, $2n = 48$, $NF = 58$; *б* – р. Кулькуты, $2n = 48$, $NF = 56$. М – мета-, СМ – субмета-, СТ – субтело-, А – акроцентрические хромосомы; цифры – порядковые номера пар хромосом в кариогамме. Масштабная линейка: 10 мм.

Цитотипы колымского подкаменщика имеют одинаковое число хромосом, сходные маркерные хромосомы. Оба цитотипа содержат четыре пары А-хромосом (рис. 3). Однако в отличие от цитотипа I ($NF = 58$) в цитотипе II отсутствует пара крупных субметацентриков (рис. 3, *a*: пары 2, 3; *б*: пара 2), а в ряду субтелоцентриков содержится на одну пару хромосом больше (цитотип I – 15, цитотип II –

16). Обнаруженные различия позволяют предположить, что в одной из пар крупных субметацентриков в цитотипе II произошла перичентрическая инверсия, следствием которой стало уменьшение числа хромосомных плеч (56) в этом цитотипе. Реальность такого механизма хромосомной перестройки у колымского подкаменщика подтверждают различия по NF кариотипов изученных

Таблица 3. Основные признаки кариотипов видов рода *Cottus*

Вид	Число хромосом ($2n$)	Хромосомная формула	Число хромосомных плеч (NF)	Публикации
<i>C. cognatus</i>	48	24M/CM+24CT/A	72	[25]
<i>C. bairdii</i>	48	24M/CM+24CT/A	72	[25]
<i>C. reinii</i>	48	12M/CM+36CT/A	60	[19]
<i>C. gobio</i>	48	10M/CM+38CT/A	58	[23]
<i>C. gobio</i>	48	6M/CM+42CT/A	54	[20]
<i>C. gobio</i>	52	6M/CM+46CT/A	58	[17]
<i>C. nozawae</i>	48	10M/CM+38CT/A	58	[18]
<i>C. pollux</i>	48	10M/CM+38CT/A	58	[19, 22]
<i>C. poecilopus</i>	48	8M/CM+40A	56	[17]
<i>C. hangiongensis</i>	48	6M/CM+42CT/A	54	[18]
<i>C. hangiongensis</i>	48	4CT+44T	52	[24]
<i>C. koreanus</i>	48	4CT+44T	52	[24]
<i>C. paulus pygmaensis</i> (<i>C. paulus</i>)	48	—	48	[21]

видов рода *Cottus*, обусловленные именно периферическими инверсиями [27].

Генетический полиморфизм *C. kolymensis*, его дифференциация на внутривидовые группы в зависимости от мест обитания, вероятно, связаны с различными темпами и направлениями эволюционных процессов в условиях географической изоляции и экологических особенностей разных биотопов. Ранее на основе сравнительного анализа было высказано мнение, что морфологическая неоднородность видов группы “*Cottus poecilopus*” может быть связана с тем, что заселение исходных форм современных пресноводных подкаменщиков в реки осуществлялось в разное время и неоднократно [2]. Исходя из имеющейся информации, можно предположить, что обнаруженные генетические отличия экземпляров колымского подкаменщика из р. Дукча, озер Чистое и Глухое, р. Кулькуты и озер колымского бассейна возникли вследствие разного времени заселения в них представителей вида и, учитывая гидрологические особенности водоемов, последующей длительной географической изоляции популяций.

Дифференциация *Cottus kolymensis*, видов группы “*Cottus poecilopus*” и остальных видов рода *Cottus*

Среди 68 видов рода *Cottus* [31] только для 13 получены последовательности полных митохондриальных геномов (*C. czerskii*, *C. volki*, *C. amblystomopsis*, *C. hangiongensis*, *C. dzungaricus*, *C. asper*, *C. perifretum*, *C. rhenanus*, *C. cognatus*, *C. koreanus*, *C. poecilopus*, *C. szanaga*, *C. bairdii*), все они использованы в нашем исследовании для сравнительного анализа. Из-за отсутствия в GenBank последовательностей генов *COI*, цитохрома *b*, *16S* рРНК *C. altaicus* и *C. kuznetzovi*, не удалось привлечь в анализ эти виды. Тем не менее полученные молекулярно-генетические данные подтверждают существование в пределах рода *Cottus* отдельной группы “*Cottus poecilopus*”, в которую входят таксоны видового ранга. Однако состав входящих в нее видов отличается от предложенного другими авторами. Судя по ML-дистанциям, к видовой группе “*Cottus poecilopus*” следует отнести *C. czerskii* и исключить из нее *C. koreanus*.

Группа “*Cottus poecilopus*” в составе *C. poecilopus*, *C. szanaga*, *C. volki*, *C. czerskii*, *C. kolymensis* характеризуется маркерными заменами нуклеотидов в генах цитохрома *b* (четыре замены) и *16S* рРНК (две замены), отличающимися их от других изученных видов рода *Cottus*. Уровень различий в пределах группы варьирует от 1.4% между *C. szanaga* и *C. czerskii* до 6.97% между *C. volki* и *C. szanaga*, а также между *C. volki* и *C. poecilopus*. Среднее значение ML-дистанций составляет 5.37% (табл. 2).

C. czerskii, которого на основе морфологических данных не относят к группе “*Cottus poecilopus*”

”, а сближают с *C. hangiongensis* [32], по молекулярно-генетическим данным наиболее близок к *C. szanaga* (1.4%) и *C. poecilopus* (3.86%) и значительно отличается от *C. hangiongensis* (9.85%). Напротив, *C. koreanus* на основе морфологических признаков относят к группе “*Cottus poecilopus*” [3], но по данным изучения контрольного региона мтДНК он наиболее близок к *C. hangiongensis* [8]. По нашим данным *C. koreanus* отличается от видов группы “*Cottus poecilopus*” так же, как от остальных изученных видов *Cottus* — в среднем на 8.62 и 8.15% соответственно. При этом значение ML-дистанции между *C. koreanus* и *C. hangiongensis* минимальное, составляет всего 6.57% (табл. 2).

Виды группы “*Cottus poecilopus*” значительно дифференцированы от других видов рода *Cottus*: ML-дистанции варьируют от 7.13% между *C. czerskii* и *C. cognatus* до 10.04% между *C. szanaga* и *C. hangiongensis* и составляют в среднем 8.1%. В сравнении со средним значением ML-дистанций в пределах группы (5.37%), с одной стороны, и со средним значением ML-дистанций между видами рода *Cottus* и внешней группой (11.27% с *Mesocottus haitej* и 14.68% с *Trachidermus fasciatus*), с другой стороны, такой уровень генетических отличий (8.1%) подтверждает существование в роде *Cottus* отдельной видовой группы “*Cottus poecilopus*”.

В пределах группы “*Cottus poecilopus*” самыми близкими видами к колымскому подкаменщику являются *C. czerskii* (среднее значение ML-дистанций составляет 4.67%) и *C. szanaga* (4.78%). Более всего *C. kolymensis* дифференцирован от *C. volki* (6.19%). *C. kolymensis* и виды рода *Cottus*, не входящие в группу “*Cottus poecilopus*”, отличаются гораздо больше — от 7.46% с *C. perifretum* до 9.51% с *C. hangiongensis*, среднее значение ML-дистанций составляет 8.08%.

Цитогенетическими методами род *Cottus* изучен крайне слабо. Кариотипированы только 10 его представителей [33] (табл. 3). Среди них *C. poecilopus* и *C. koreanus*, которые так же, как и исследованный вид *C. kolymensis*, входят в состав группы “*Cottus poecilopus*” [1]. В ходе сравнительного анализа установлено, что кариотипы *C. kolymensis* и других изученных видов рода, за исключением *C. gobio* [19], имеют одинаковое число хромосом (рис. 3, табл. 3). Объяснить возникновение отличий хромосомного набора *C. gobio* по $2n$ от кариотипов других исследованных представителей *Cottus* не представляется возможным из-за низкого качества представленных в работе метафазной пластинки и кариограммы. Н. Ида с соавт. (1989) было высказано предположение о неверной идентификации изученных экземпляров [24]. Основные признаки хромосомных наборов *C. kolymensis* (цитотип I) и видов *C. gobio*, *C. nozawae*, *C. pollux* сходны по числу, морфологии хромосом и числу хромосомных плеч (рис. 3; табл. 3). Однако другие изу-

ченные виды подкаменщиков отличаются не только от них, но и друг от друга по количественному соотношению двуплечих (М/СМ) и одноплечих (СТ/А) хромосом и, как следствие, по числу хромосомных плеч (табл. 3). Возникновение обнаруженных различий, по мнению специалистов, объяснимо тем, что эволюция кариотипов видов рода *Cottus* происходила путем перичентрических инверсий [27].

Родственные связи *Cottus kolyomensis*

На филогенетическом дереве (рис. 2) мтДНК колымского подкаменщика находится в кластере С, объединяющем виды группы “*Cottus poecilopus*”. В основании этого кластера расположен *C. volki*. Затем следует микрокластер, включающий виды (*C. szanaga* + *C. czerskii*) + *C. poecilopus*, к которым присоединяется *C. kolyomensis*. Топология байесовского дерева с высокой достоверностью подтверждает существование видовой группы “*Cottus poecilopus*”, в состав которой входят *C. poecilopus*, *C. szanaga*, *C. volki*, *C. czerskii*, *C. kolyomensis*. Терминальное положение кластера С предполагает недавнюю дивергенцию группы “*Cottus poecilopus*”. МтДНК *C. koreanus*, включенного ранее в эту группу видов, попадает в кластер А вместе с *C. hangiongensis* и *C. amblystomopsis*. Базальное положение кластера А предполагает раннюю дивергенцию и близость к предковой форме видов *C. koreanus*, *C. hangiongensis* и *C. amblystomopsis*.

Сравнительный анализ результатов настоящей работы и других молекулярно-генетических исследований видов рода *Cottus* показывает значительное совпадение данных. В одном из последних исследований, которое включает большинство полных митохондриальных геномов видов рода из GenBank, NJ филогенетическое дерево ([34]: Figure 2) имеет сходную топологию. У основания дерева находится линия В в составе *C. hangiongensis*, *C. amblystomopsis*, *C. reinii*, *C. poecilopus* (= *C. koreanus* в соответствии с номером в GenBank EU332750). Линия А1 включает виды группы “*Cottus poecilopus*”: близкие *C. szanaga* и *C. czerskii*, а также *C. volki*. Линия А2 представлена *C. rhenanus*, *C. perifretum*, *C. dzungaricus*. По мнению авторов, в роде *Cottus* виды линии В дивергировали раньше, а виды линий А1 и А2 позже.

В нашем исследовании впервые проведен анализ кариотипа *C. kolyomensis*, который показал, что хромосомные наборы этого вида и подкаменщиков рода *Cottus* имеют общие признаки, указывающие на их таксономическую близость. Впервые проведен анализ изменчивости генов *COI*, цитохрома *b* и *16S* рРНК мтДНК *C. kolyomensis*, подтверждающий видовой статус колымского подкаменщика. Впервые изучены представители вида из озер бассейна р. Колымы. Выявлен комплекс кариологических и молекулярно-генетических мар-

керных признаков, позволяющих идентифицировать *C. kolyomensis*. Установлены различия цитотипов экземпляров колымского подкаменщика из р. Дукча и р. Кулькаты, которые могли возникнуть вследствие разного времени заселения представителей вида в эти реки, последующей географической изоляции популяционной группировки вида из р. Кулькаты. Обнаружены генетические различия популяций *C. kolyomensis*, населяющих водоемы бассейнов р. Колымы и северной части Охотского моря, на основании которых вид подразделяется на три группы в соответствии с местом обитания. На основе молекулярно-генетических данных подтверждено существование видовой группы “*Cottus poecilopus*” и принадлежность к ней вида *C. kolyomensis*. В противоположность данным морфологических исследований мы предлагаем включить в состав группы “*Cottus poecilopus*” вид *C. czerskii* и вывести из нее вид *C. koreanus*.

Авторы благодарны к.б.н. Сергею Грунину (ИБПС ДВО РАН), к.б.н. Елене Хаменковой (ИБПС ДВО РАН), Виталию Поспехову (ИБПС ДВО РАН) за помощь в сборе материала.

Работа выполнена при бюджетной поддержке в рамках НИР “Фауна, систематика и экология морских и пресноводных гидробионтов Северо-Востока России” (Российская Федерация, № 0290-2019-0004), Институт биологических проблем Севера ДВО РАН, Россия.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сиделева В.Г., Гомо А. Новый вид подкаменщика *Cottus kolyomensis* sp. nova (Scorpaeniformes: Cottidae) из рек Колымского края // Вопр. ихтиологии. 2012. Т. 52. № 3. С. 288–294. <https://doi.org/10.1134/S0032945212020130>
2. Черешнев И.А. Подкаменщик рода *Cottus* (Cottidae) из бассейна реки Чаун (арктическая Чукотка) // Вопр. ихтиологии. 1982. Т. 22. № 1. С. 15–26.
3. Сиделева В.Г., Гомо А. Видовой статус и переописание трех видов группы *Cottus poecilopus* (Cottidae) Евразии // Вопр. ихтиологии. 2009. Т. 49. № 5. С. 617–631.
4. Парин Н.В., Евсеенко С.А., Васильева Е.Д. Рыбы морей России: аннотированный каталог. М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2014. 733 с.
5. Токранов А.М., Липнягов С.В., Ким О.О. Подкаменщик рода *Cottus* Linnaeus (Cottidae) из бассейна р. Ука (Северо-Восток Камчатки) // Чтения памяти Владимира Яковлевича Леванидова. Вып. 8. Владивосток: Дальнаука, 2019. С. 166–174. <https://doi.org/10.25221/levanidov.08.17>

6. Богданов Б.Э., Свердлова Т.В., Книжин И.Б. Изменчивость и таксономический статус сибирских популяций пестрогого подкаменщика *Cottus poecilopus* complex (Scorpaeniformes: Cottidae) // Журн. Сиб. федерального ун-та. Биология. 2013. Т. 6. № 1. С. 18–31.
7. Кириллов А.Ф., Ансолихова О.Д., Журков Ф.Н. и др. Аннотированный список рыбообразных и рыб бассейна Восточно-Сибирского моря // Исследования водных биологических ресурсов Камчатки и Северо-Западной части Тихого океана. 2016. Вып. 42. С. 78–87.
<https://doi.org/10.15853/2072-8212.2016.42.78-87>
8. Yokoyama R., Sideleva V.G., Shedko S.V., Goto A. Broad-scale phylogeography of the Palearctic freshwater fish *Cottus poecilopus* complex (Pisces: Cottidae) // J. Mol. Phylogen. Evol. 2008. V. 48. P. 1244–1251.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.02.002>
9. Radchenko O.A., Moreva I.N., Petrovskaya A.V. The subfamily Myoxocephalinae of cottid fishes (Cottidae): Genetic divergence and phylogenetic relationships // J. Fish Biol. 2021. V. 99. P. 1857–1868.
<https://doi.org/10.1111/jfb.14886>
10. Черешнев И.А., Шестаков А.В., Скопец М.Б. Определитель пресноводных рыб Северо-Востока России. В.: Дальнаука, 2001. 129 с.
11. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab., 1982. 480 p.
12. Moreva I.N., Radchenko O.A., Petrovskaya A.V. Differentiation of the frog sculpin *Myoxocephalus stelleri* Tilesius, 1811 (Actinopterygii, Cottidae) based on mtDNA and karyotype analyses // Comp. Cytogenet. 2021. V. 15. № 2. P. 179–197.
<https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v15.i2.63207>
13. Kumar S., Stecher G., Li M. et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. P. 1547–1549.
14. Ronquist F., Teslenko M., Van Der Mark P. et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space // Syst. Biol. 2012. V. 61. P. 539–542.
15. Rambaut A., Drummond A.J., Xie D. et al. Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using tracer 1.7 // Syst. Biol. 2018. V. 67. P. 901–904.
16. Leache A.D., Reeder T.W. Molecular systematics of the eastern fence lizard (*Sceloporus undulatus*): A comparison of parsimony, likelihood, and Bayesian approaches // Syst. Biol. 2002. V. 51. P. 44–68.
17. Kligerman A.D., Bloom S.E. Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes // J. Fish. Res. Board Can. 1977. V. 34. P. 266–269.
18. Levan A., Fredga K., Sandberg A.A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes // Hereditas. 1964. V. 52. P. 201–220.
19. Starmach J. Die Chromosomen von *Cottus poecilopus* Heckel und *Cottus gobio* L. // Acta Hydrobiol. 1967. V. 9. P. 301–307.
20. Abe S. Notes on the chromosomes of two species of fresh-water cottid fishes // Chromosome Inform. Service. 1972. V. 13. P. 25–27.
21. Abe S. A cytotaxonomical study in some freshwater cottid fishes (Cottidae, Pisces) // Cytologia. 1976. V. 41. P. 323–329.
22. Berberović L.J., Sofradžija A., Vagner L.J. The chromosomes of the species *Cottus gobio* L. (Cottidae, Pisces) // Got. Biol. Inst. Univ. Sarajevu. 1978. V. 27. P. 5–15.
23. Gold J.R., Karel W.J., Strand M.R. Chromosome Formulae of North American Fishes. Texas A & M Univ. System, 1979. 24 p.
24. Ida H., Terashima H., Fujimi T. Karyotypes in four species of the family Cottidae // Japan J. Ichthyol. 1989. V. 36. P. 135–140.
<https://doi.org/10.1007/BF02905683>
25. Vitturi R., Rasotto M.B. Karyotype analysis of *Cottus gobio* L. (Pisces, Cottidae) // Cytobios. 1990. V. 62. P. 81–86.
26. Park G.M., Song H.B. Karyotypes of five species in Odontobutidae and Cottidae of Korea // Kor. J. Ichthyol. 2006. V. 18. P. 155–162.
27. Thompson K., Whitcomb S., Choudhry E. et al. Karyotypes of *Cottus cognatus*, *C. bairdi*, and their hybrids in central Pennsylvania // J. Pennsylvania Acad. Sci. 2020. V. 93. № 1. P. 37–46.
<https://doi.org/10.5325/jpennacadsci.93.1.0037>
28. Yamazaki A., Markevich A., Munehara H. Molecular phylogeny and zoogeography of marine sculpins in the genus *Gymnocanthus* (Teleostei; Cottidae) based on mitochondrial DNA sequences // Mar. Biol. 2013. V. 160. P. 2581–2589.
<https://doi.org/10.1007/s00227-013-2250-4>
29. Kontula T., Kirilchik S.V., Väinölä R. Endemic diversification of the monophyletic cottoid fish species flock in Lake Baikal explored with mtDNA sequencing // Mol. Phylogen. Evol. 2003. V. 27. P. 143–155.
[https://doi.org/10.1016/s1055-7903\(02\)00376-7](https://doi.org/10.1016/s1055-7903(02)00376-7)
30. Ao M., Xie P., Zhao G. et al. The complete mitochondrial genome of *Cottus sibiricus altaicus* (Scorpaeniformes: Cottidae) // Mitochondrial DNA. 2016. V. 27. № 2. P. 1315–1316.
<https://doi.org/10.3109/19401736.2014.945573>
31. Fricke R., Eschmeyer W.N., van der Laan R. (eds) Eschmeyer's catalog of fishes: Genera, species, references. 2022. (<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>). Electronic version accessed April 01, 2022.
32. Савельев П.А., Колпаков Е.В. Морфологическое описание, внутривидовая изменчивость и родственные связи подкаменщика Черского *Cottus czerskii* (Cottidae) // Вопр. ихтиологии. 2018. Т. 58. № 2. С. 144–153.
<https://doi.org/10.7868/S0042875218020030>
33. Arai R. Fish Karyotypes. A Check List. Tokyo; Berlin; Heidelberg; New York: Springer, 2011. 347 p.
<https://doi.org/10.1007/978-4-431-53877-6>
34. Yang T., Meng W., Xuhui W. et al. The complete mitochondrial genome of endemic freshwater sculpin *Cottus dzungaricus* (Scorpaeniformes: Cottidae) revealed by high-throughput NGS: Genome structure and its phylogenetic relationships // Turkish J. Fish. Aquat. Sci. 2020. V. 20. № 1. P. 29–37.
https://doi.org/10.4194/1303-2712-v20_1_03

**Genetic Differentiation and Relationships *Cottus kolymensis*
Sideleva et Goto, 2012 (Cottidae)**

O. A. Radchenko^{a, *}, I. N. Moreva^{a, b}, and A. V. Petrovskaya^a

^a*Institute of Biological Problems of the North, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Magadan, 685000 Russia*

^b*Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far East Branch,
Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690041 Russia*

**e-mail: mradchenko@mail.ru*

For the first time, a karyological and molecular genetic (*COI*, cytochrome *b*, *16S* rRNA genes) study of the freshwater fish species *Cottus kolymensis*, recently described from the Dukcha and Kolyma rivers in northeast Asia, was carried out. A complex of karyological and molecular-genetic marker traits has been determined to identify the species. Genetic differences between the populations of *C. kolymensis* inhabiting the water bodies of the river basins of Kolyma and the northern part of the Sea of Okhotsk were found. On their basis the species is divided into groups in accordance with the habitat. The existence of a separate group "*Cottus poecilopus*" within the genus *Cottus*, which includes taxa of the species rank, including *C. kolymensis*, has been confirmed.

Keywords: cottid fishes, karyotype, marker chromosomes, mitochondrial DNA (mtDNA), genes *COI*, cytochrome *b*, *16S* rRNA, molecular phylogeny, pericentric inversions.

МОНИТОРИНГ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИИ СОБОЛЯ (*Martes zibellina* Linnaeus, 1758) СРЕДНЕГО ПРИАМУРЬЯ

© 2023 г. Л. В. Фрисман¹, *, А. Л. Брыкова¹

¹Институт комплексного анализа региональных проблем Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Биробиджан, 679014 Россия

*e-mail: l.frisman@mail.ru

Поступила в редакцию 09.06.2022 г.

После доработки 25.08.2022 г.

Принята к публикации 30.08.2022 г.

На основе анализа микросателлитных локусов *Ma3* и *Mer041* проведен мониторинг генетической структуры популяции соболя Среднего Приамурья по материалам охотничьих сборов зимних сезонов с 2011 по 2021 г. Рассмотрены три географические субпопуляции соболя Буреинского нагорья и одна с восточных склонов хребта Сихотэ-Алинь. Показано, что группа специфических аллелей, характеризующих различия соболиного населения Буреинского нагорья и Сихотэ-Алиня, представлена четырьмя аллелями. Проведенный мониторинг двух микросателлитных локусов в субпопуляциях Буреинского нагорья показал более высокое аллельное разнообразие в северной автохтонной по сравнению с более южными, возникшими на основе расселения северной в первой половине XX в. Показана относительная однородность популяционной структуры соболя Буреинского нагорья, как правило не приводящая к статистически значимому уровню дифференциации субпопуляций ни в пространстве, ни во времени. Обнаружен различающийся характер динамики аллельного разнообразия в субпопуляциях левобережья (Буреинское нагорье) и правобережья (хребет Сихотэ-Алинь) р. Амур. Выдвинута гипотеза, что временная гетерогенность в Сихотэ-Алинской субпопуляции может указывать на существование на восточных склонах Сихотэ-Алиня пространственно неоднородной популяционной структуры, сформированной из потомков и возможных гибридов Сихотэ-Алинской автохтонной и интродуцированных форм. Рассматривается влияние антропогенного фактора на динамику генетической структуры.

Ключевые слова: соболь, микросателлиты, аллельное разнообразие, генетическая дифференциация, Буреинское нагорье, хребет Сихотэ-Алинь.

DOI: 10.31857/S0016675823040033, **EDN:** AVCRVZ

Соболь (*Martes zibellina* Linnaeus, 1758) – промысловый пушной вид млекопитающих, заселяющий хвойные и смешанные леса северной Евразии. Его ареал протяжен от Урала до Тихого океана по территории России и частично захватывает сопредельные страны: Монголию, Китай, Корею и Японию. В первой половине XX в. высокая ценность пушнины и бесконтрольный отлов привели к практически полному исчезновению соболя на российской части ареала. Запрет промысла и последующая интродукция животных на угнетенные территории из сохранившихся популяций отдаленных участков ареала восстановили численность, но сформировавшаяся структура популяций отдельных регионов и вида в целом должна была, несомненно, отличаться от исходной, что привлекает внимание к ее описанию и изучению.

Исследование генетической изменчивости и структуры популяций соболя было начато на основе анализа маркеров митохондриальной ДНК на

материале северо-восточной части ареала [1, 2] и затем расширено на пределы всего ареала [3, 4]. Для исследования генетической структуры природных популяций соболя в настоящее время активно и успешно применяется анализ микросателлитов – кодоминантно наследуемых и адаптивно нейтральных ядерных генетических маркеров. Проведено исследование соболя пространственно разобщенных территорий (Урал, Сибирь, хребет Сихотэ-Алинь и п-ов Камчатка) [5, 6]. В настоящее время все более пристальное внимание уделяется генетическому исследованию соболиного населения отдельных географических районов [7–9]. Такие работы позволяют рассмотреть влияние глобального эксперимента, проведенного в прошлом столетии, на генетическую структуру соболя конкретного региона.

Интерес к сравнению современной популяционной структуры соболей Буреинского нагорья (левобережье Амура) и восточной части хреб-

та Сихотэ-Алинь (правобережье Амура) обусловлен рядом факторов. Наиболее значимые из них: история формирования ареала в данном регионе и генетическая специфика различных интродукций в XX в. Горный рельеф, долготное направление, приокеаническое положение и отсутствие покровного оледенения позволили Сихотэ-Алиню даже в самые холодные времена плейстоцена сохранить лесные рефугиумы [10]. К.Г. Абрамов первым предположил, что после последнего плейстоценового оледенения именно с этой территории происходило расселение соболя [11]. Исследование митохондриальной и ядерной ДНК подтвердило это предположение [6, 12, 13].

После антропогенно организованного падения численности начала XX в. очаги автохтонных соболей сохранились на Сихотэ-Алине лишь в недоступных человеку горных участках. На большей части Буреинского хребта соболя были также изведены. Однако на севере Буреинского хребта они сохранились в количестве достаточном для организации в 1952 г. Буреинского соболиного племенного рассадника, откуда зверьки были расселены в различные регионы России, в том числе по Буреинскому нагорью на юг, включая хребет Малый Хинган, и по Сихотэ-Алиню [14]. На Сихотэ-Алине, кроме того, были заселены зверьки из Иркутской области [15]. Исследование географических группировок соболей Среднего Приамурья, разделенных эколого-географическим барьером — р. Амур с прилегающей к ней Средне-Амурской низменностью, позволяет сопоставить популяционную структуру современных обитателей территории Буреинского соболиного рассадника, потомков интродуцентов на территории более южных районов Буреинского хребта и хребта Малый Хинган, а также обитателей восточных районов Сихотэ-Алиня — возможных потомков и гибридов Сихотэ-Алинской автохтонной формы и двух интродуцированных.

В силу большой сложности сбора материала исследование природных популяций соболя обычно опирается на суммарные выборки в пространстве (по ближайшим географическим районам) и во времени (сборы нескольких лет). Такой подход дает усредненные характеристики внутривидового разнообразия обитателей конкретного региона, не позволяя отследить внутривидовые изменения во времени, которые могли бы стать базой для эколого-генетического исследования. В отличие от такого подхода генетический мониторинг охотничьих сборов — возможный источник информации, потенциально позволяющий приблизить нас к пониманию влияния антропогенного изъятия на генетическую структуру данного природного объекта в конкретном регионе в определенный отрезок времени.

Настоящая работа является начальным этапом мониторингового исследования соболя Среднего Приамурья. Цель работы — провести анализ изменения популяционной генетической структуры соболей Среднего Приамурья по материалу охотничьих сборов зимних сезонов 2011/2012–2020/2021 гг. Рассматриваются микросателлиты *Ma3* и *Mer041*, по которым у соболей Сихотэ-Алиня ранее были обнаружены специфичные аллели в сравнении с обитателями как географически удаленных (Сибирь, Урал, Камчатка) [6], так и буреинской [16] частей ареала.

Проводимый мониторинг позволит оценить изменения в генетической структуре животных отдельных районов Среднего Приамурья, а также значимость выявленных маркеров для характеристики различий в популяциях соболя левого и правого берега р. Амур.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал от 565 особей из четырех географических районов предоставлен охотниками, имеющими лицензии на отлов соболей. Ни одно животное не было отловлено специально для данной работы. Полученный материал охватывает охотничьи сезоны от 2011/2012 до 2020/2021 гг. Исследуемые субпопуляции, локализованные на Буреинском нагорье, расположенном по левую сторону от р. Амур, условно обозначены нами как “Маган”, “Сутырь” и “Каменушка”; по правую сторону — “Сихотэ-Алинь”. Субпопуляция “Маган” расположена на территории ранее существовавшего Буреинского соболиного племенного рассадника. На рис. 1 и в табл. 1 представлено географическое происхождение, посезонное и численное распределение собранного материала.

ДНК для исследования полиморфизма микросателлитных локусов выделяли из фиксированных в спирте тканей с использованием стандартного метода солевой экстракции [17]. Режим амплификации и последовательности примененных праймеров взяты из работы С.Н. Каштанова с соавт. [18]. Участки ДНК, соответствующие выбранным локусам, амплифицировали с помощью прямого и обратного праймеров производства ООО “Бигль” (Санкт-Петербург). Один из них был флуоресцентно помечен по 5'-концу красителем 6-FAM. Анализ длин фрагментов проводили на восьмиканальном генетическом анализаторе AB-3500 в гель-полимере POP 7 и в присутствии маркера молекулярной массы LIZ 600. Идентификацию локуса проводили с помощью программы Gene Mapper, версия 4.1 (Applied Biosystems, США). Аллели рассматриваемых локусов в тексте обозначены цифрами их длины с нижним подчеркиванием.

Оценка результатов изучения полиморфизма была проведена на основе анализа генотипических и

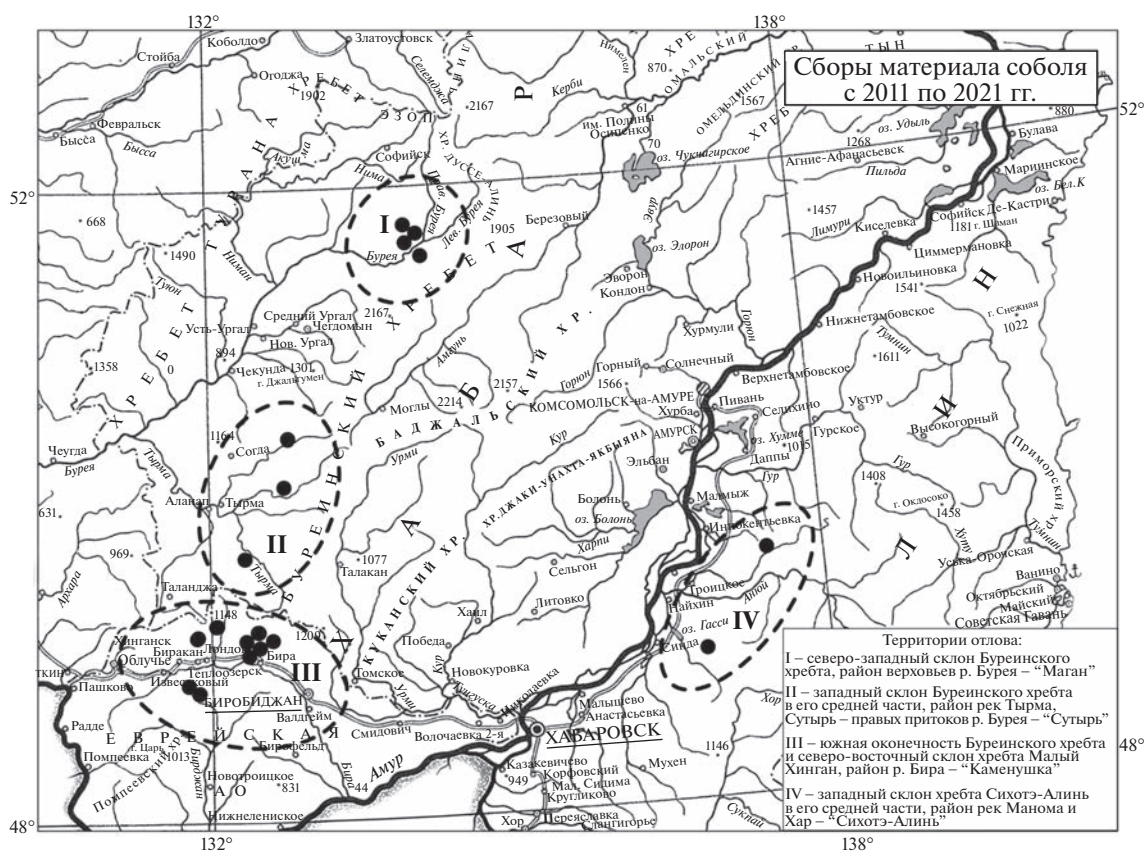


Рис. 1. Географическая локализация исследуемого материала соболя на территории Среднего Приамурья.

аллельных частот. Оценки частот аллелей в географических выборках вычислялись по формуле [19]:

$$\hat{p}_i = \left(n_{i,i} + 0.5 \sum_{j=1}^r n_{i,j} \right) / N,$$

где $\hat{p}_i$ – искомая частота i -го аллеля, r – количество аллелей в полиморфном локусе, $n_{i,j}$ – число особей с генотипом, соответствующим комбинации i, j -аллелей в локусе, N – объем выборки; и их стандартная ошибка:

$$SE(\hat{p}_i) = \sqrt{\text{Var}(\hat{p}_i)},$$

где $\text{Var}(\hat{p}_i)$ – выборочная биномиальная дисперсия (σ^2) в состоянии равновесия популяции по Харди–Вайнбергу:

$$\text{Var}(\hat{p}_i) = \hat{p}_i(1 - \hat{p}_i)/2N.$$

Если в выборке состояние равновесия нарушено, то

$$\text{Var}(\hat{p}_i) = (\hat{p}_i + n_{i,i}/N - 2\hat{p}_i^2)/2N.$$

Оценки неравновесности сцепления генов, наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности, соответствия распределению Харди–Вайнберга, а также

подсчет дистанций на основе попарных F_{ST} проводили в программе Arlequin (версия 3.5 2020) [20].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Рассматриваемые локусы *Ma3* и *Mer041* не показали неравновесного сцепления (при уровне значимости 0.05), что указывает на их локализацию в различных хромосомах.

В суммарной выборке из 565 экземпляров обнаружено пять аллелей локуса *Ma3*: 125, 129, 131, 133 и 135. В выборках охотничьих сезонов географических субпопуляций Буреинского нагорья обнаружено по 3–4 аллеля и по 2–4 аллеля в сезонных выборках хребта Сихотэ-Алинь (табл. 2). В каждой из географических субпопуляций и во все сезоны основным (частота встречаемости >0.5) является аллель 131 (рис. 2). Второй по встречаемости аллель 133 также обнаружен во всех рассматриваемых субпопуляциях и во все сезоны. В субпопуляциях Буреинского нагорья сезонные изменения частоты этих аллелей лежат в пересекающейся области их стандартных ошибок. Исключение составляет субпопуляция “Маган”, где по частотам наиболее представленного аллеля 131 наблюдается разделение сезонных сборов на две группы, в

Таблица 1. Географическая локализация и количество исследуемого материала соболя по сезонам

Район сбора материала	Общее число животных	Количество животных в отдельные охотничьи сезоны							
		2011–2012	2012–2013	2013–2014	2014–2015	2015–2016	2017–2018	2019–2020	2020–2021
Северо-западный склон Буреинского хребта, район верховьев р. Бурея – “Маган”	148	–	14	21	51	–	–	43	19
Западный склон Буреинского хребта в его средней части, район рек Тырма, Сутырь – правых притоков р. Бурея – “Сутырь”	146	–	51	30	35	30	–	–	–
Южная оконечность Буреинского хребта и северо-восточный склон хребта Малый Хинган, район р. Бира – “Каменушка”	148	19	15	49		34	–	–	31
Западный склон хребта Сихотэ-Алинь в его средней части, район рек Манома, Хар – “Сихотэ-Алинь”	123	–	30	28	–	16	23	26	–
Суммарно	565	19	110	128	86	80	23	69	50

Таблица 2. Генетические характеристики исследованных микросателлитных локусов

Сезон	N	Ma3				Mer041			
		n	H _O	H _E	pH-W	n	H _O	H _E	pH-W
Северо-западный склон Буреинского хребта, район верховьев р. Буря – “Маган”									
2012–2013	14	3	0.429	0.373	1	8	0.714	0.852	0.35
2013–2014	21	4	0.334	0.362	0.67	9	0.857	0.825	0.11
2014–2015	51	3	0.471	0.512	0.12	8	0.588	0.757	0.001
2019–2020	43	3	0.488	0.569	0.02	8	0.721	0.828	0.06
2020–2021	19	3	0.579	0.542	1	8	0.842	0.818	0.61
Западный склон Буреинского хребта в его средней части, район рек Тымра, Сутырь – правых притоков р. Буря – “Сутырь”									
2012–2013	51	3	0.490	0.547	0.07	9	0.824	0.844	0.16
2013–2014	30	3	0.534	0.542	0.39	6	0.633	0.813	0.002
2014–2015	35	3	0.543	0.545	0.11	8	0.857	0.816	0.79
2015–2016	30	3	0.434	0.493	0.11	8	0.500	0.823	0.002
Южная оконечность Буреинского хребта и северо-восточный склон хребта Малый Хинган, район р. Бира – “Каменушка”									
2011–2012	19	3	0.474	0.482	1	6	0.842	0.784	0.33
2012–2013	15	3	0.467	0.476	0.25	8	0.933	0.860	0.89
2013–2014	49	4	0.33	0.49	0.002	8	0.57	0.81	0.015
2015–2016	34	3	0.382	0.453	0.21	8	0.706	0.797	0.36
2020–2021	31	3	0.355	0.484	0.14	9	0.774	0.821	0.20
Западный склон хребта Сихотэ-Алинь в его средней части, район рек Манома, Хар – “Сихотэ-Алинь”									
2012–2013	30	3	0.434	0.389	1	12	0.700	0.897	0.03
2013–2014	28	2	0.179	0.223	0.35	9	0.643	0.873	0.02
2015–2016	16	2	0.063	0.063	1	7	0.500	0.782	0.01
2017–2018	23	4	0.348	0.556	0.023	11	0.478	0.906	0
2019–2020	26	3	0.154	0.212	0.28	11	0.962	0.894	0.15

Примечание. N – число животных, n – обнаруженное количество аллелей, H_O – гетерозиготность наблюдаемая, H_E – гетерозиготность ожидаемая, pH-W – точная вероятность соответствия распределению Харди–Вайнберга.

каждой из которых частоты близки между собой, но обнаруживается падение частоты этого аллеля между сезонами 2013/2014 и 2014/2015. Однако согласно критерию хи-квадрат Пирсона нуль-гипотеза равенства частот аллеля 131 в этих сезонных выборках не отклоняется (уровень значимости различий $0.05 < p \leq 0.1$).

Иная картина представлена в субпопуляции “Сихотэ-Алинь”, где обнаружены резкие статистически значимые колебания частот этих аллелей от сезона к сезону. Достоверность этих различий обнаруживается при сравнении выборок пар сезонов 2015/2016 с 2017/2018 и 2017/2018 с 2019/2020 (уровень значимости равен 0.01). Наблюдаемые различия недостоверны при сравнении материала пар сезонов 2012/2013 с 2013/2014 и 2013/2014 с 2015/2016 (уровень значимости равен 0.1). Анало-

гичная картина межсезонного изменения частот обнаружена и для аллеля 133 этой субпопуляции.

Аллель 135, третий по встречаемости в субпопуляциях Буреинского нагорья, в более северных субпопуляциях “Маган” и “Сутырь” представлен в материале всех рассматриваемых сезонов с изменениями частоты в основном в пределах стандартной ошибки. В южной субпопуляции “Каменушка” наблюдается статистически достоверное изменение частоты этого аллеля. Он значимо представлен в материале сезонов 2011/2012–2012/2013 и обнаруживается как редкий в выборках последующих сезонов. Данный аллель, определенный как специфичный для субпопуляций Буреинского нагорья по сборам охотничьего сезона 2012/2013 [16], появляется в качестве редкого на Сихотэ-Алине в охотничьи сезоны 2017/2018 и 2019/2020 (рис. 2).

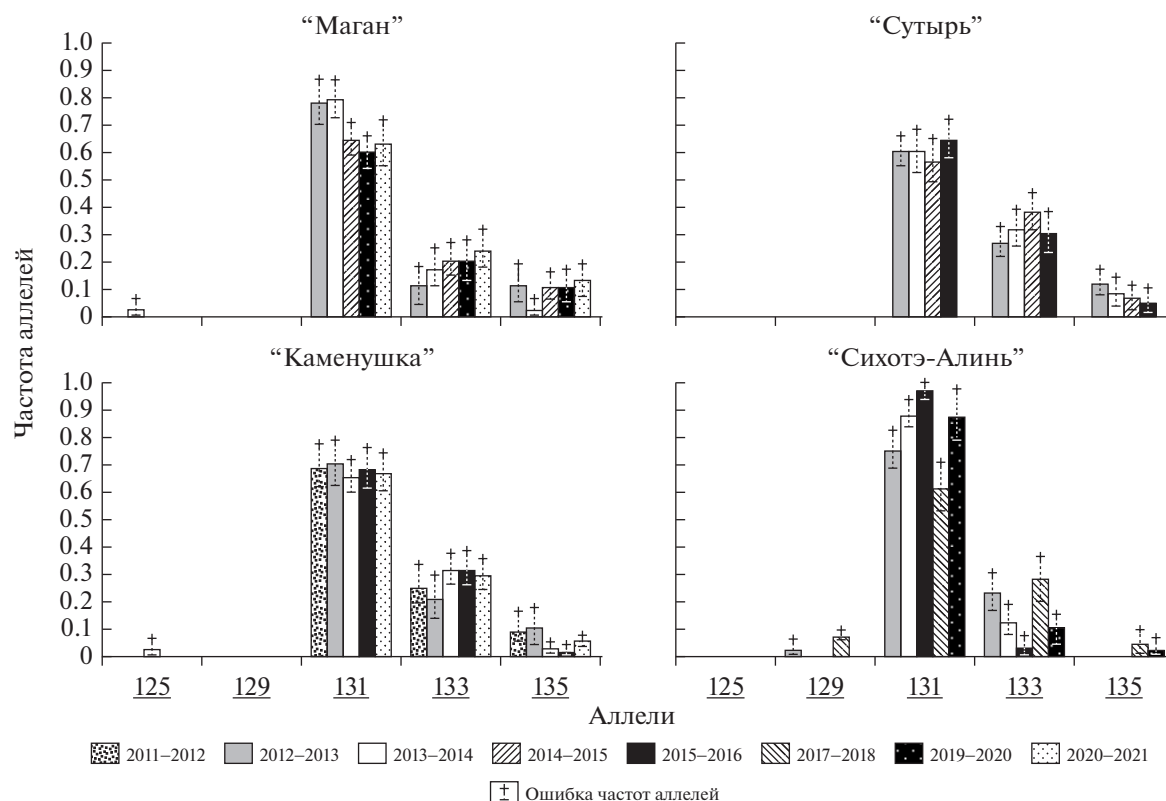


Рис. 2. Распределение частот аллелей локуса *Ma3* по сезонам в субпопуляциях.

Аллель 129 обнаружен только в Сихотэ-Алинской субпопуляции в сборах двух сезонов, с частотой встречаемости, достигающей до 0.07.

Редкий аллель 125 обнаружен только на Буреинском нагорье в субпопуляциях “Маган” и “Каменушка”.

В суммарной выборке из 565 экземпляров обнаружено 13 аллельных вариантов локуса *Mer041*: 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160 и 162 (рис. 3, 4). В сезонных выборках соболя Буреинского нагорья представлено от шести до девяти аллелей (в среднем по 8.1 на субпопуляцию за сезон). В Сихотэ-Алинских сезонных сборах встречается от 7 до 12 аллелей (в среднем 10). Данный локус нередко показывает значимые колебания частот аллелей от сезона к сезону. Но практически во всех сезонных выборках севера (“Маган”) и центральной части (“Сутырь”) Буреинского нагорья наиболее часто встречающимся является аллель 146. В южной субпопуляции (“Каменушка”) этот аллель наиболее часто встречается в сезонах 2013/2014, 2015/2016, 2020/2021 г. В другие сезоны преобладающими являются аллели 140 (2011/2012) и 150 (2012/2013). Иная картина наблюдается в Сихотэ-Алинской субпопуляции. Наиболее часто встречающийся аллель здесь, как правило, меняется от сезона к сезону.

По данным исследования соболей охотничьего сезона 2012/2013 редкие аллели 138, 160 и 162 являлись уникальными для Сихотэ-Алинской субпопуляции. По результатам мониторинга обнаружено присутствие аллеля 138 в Сихотэ-Алинской субпопуляции в четырех из пяти рассматриваемых сезонов. Однако этот аллель встречен и у соболей севера Буреинского хребта в сезоны 2019/2020 и 2020/2021. Редкий аллель 160 был обнаружен в Сихотэ-Алинской субпопуляции в составе материала трех сезонов: 2012/2013, 2017/2018 и 2019/2020. Также он был обнаружен в один из сезонов и на севере Буреинского хребта. По данным проведенного мониторинга лишь один аллель этого локуса 162 остался маркерным для Сихотэ-Алинской субпопуляции и был повторно встречен здесь в сезон 2019/2020 гг.

Сравнение величин наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности (табл. 2) показывает некоторый недостаток гетерозигот в большинстве из 19 рассматриваемых географических сезонных выборок. Но для локуса *Ma3* наблюдаемый недостаток гетерозигот, как правило, незначителен и большая часть сезонных географических выборок (16 из 19) показывает соответствие распределения генотипов соотношению Харди–Вайнберга (на уровне значимости 0.05). Нарушение равновесия по этому локусу наблюдается на севере Буреинского хреб-

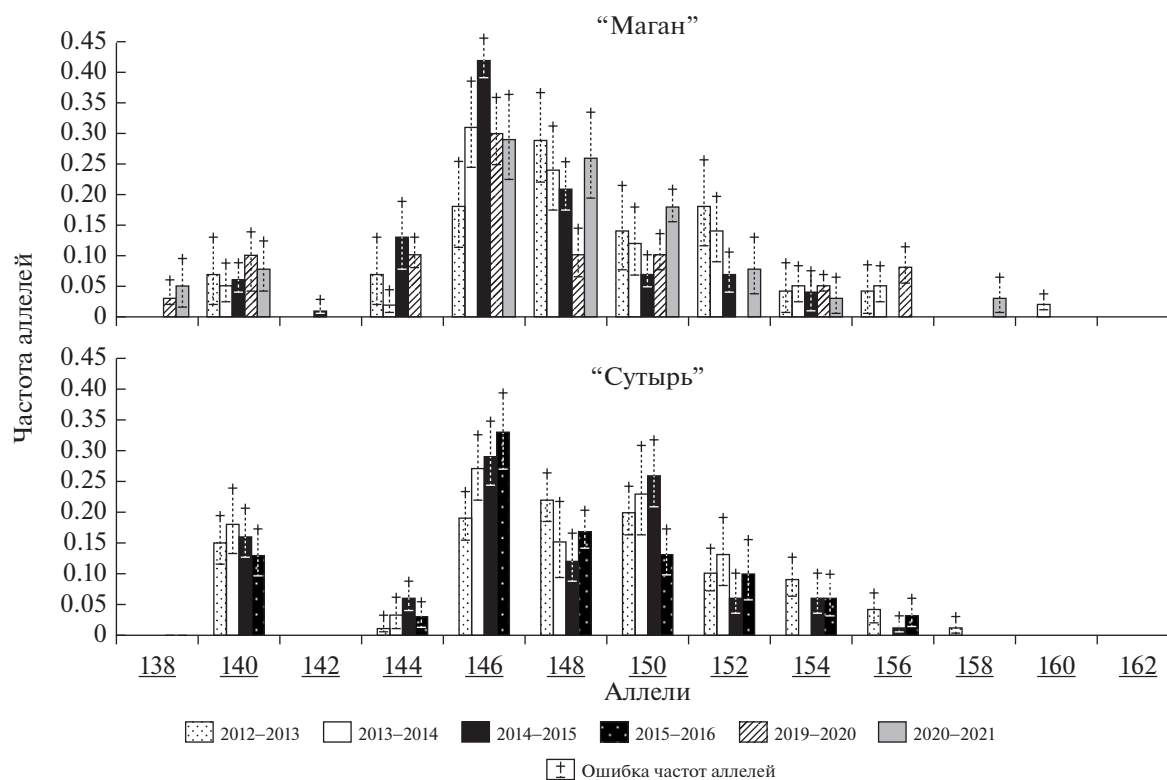


Рис. 3. Распределение частот аллелей локуса *Mer041* по сезонам в субпопуляциях “Маган” и “Сутырь”.

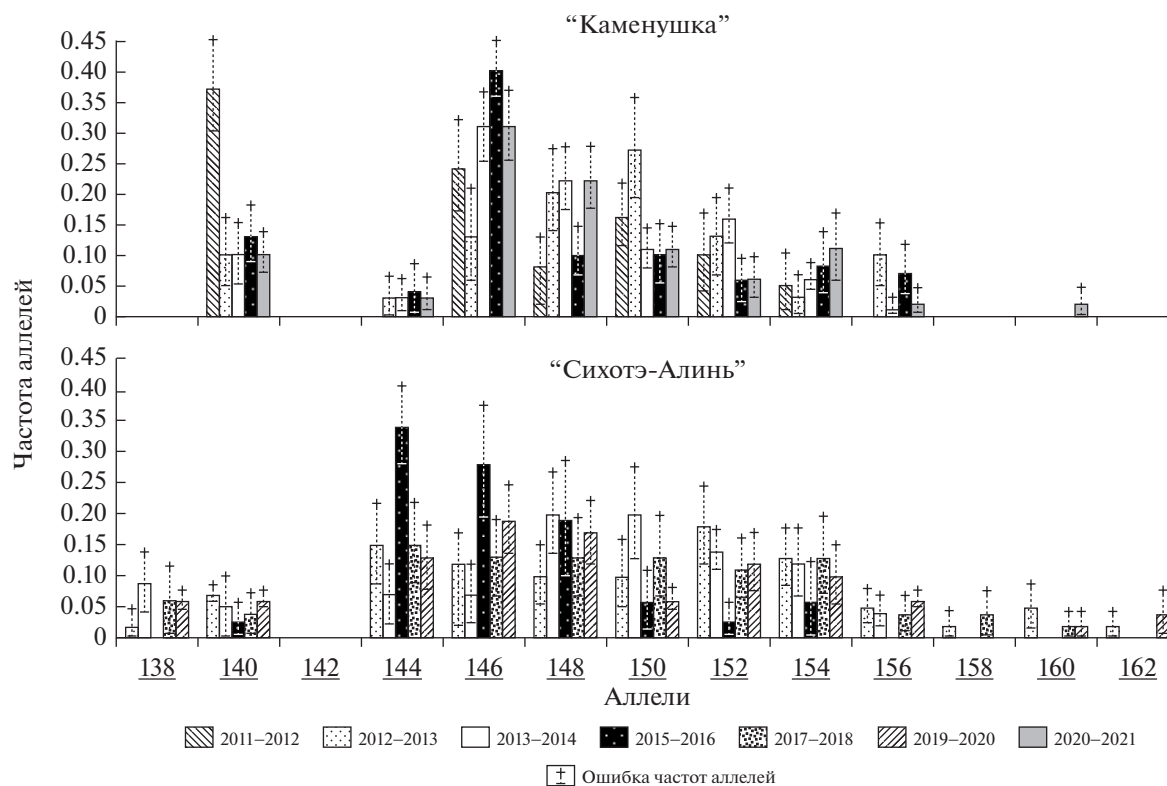


Рис. 4. Распределение частот аллелей локуса *Mer041* по сезонам в субпопуляциях “Каменушка” и “Сихотэ-Алинь”.

Таблица 3. Разброс межсезонных значений генетических дистанций (по попарным F_{ST} для географических субпопуляций соболя Среднего Приамурья)

Субпопуляции	“Маган”	“Сутырь”	“Каменушка”	“Сихотэ-Алинь”
“Маган”	0.028–0.002			
“Сутырь”	0.051–0.001	0.008–0.001		
“Каменушка”	0.048–0.001	0.021–0.001	0.028–0.003	
“Сихотэ-Алинь”	0.102–0.003	0.138–0.007	0.132–0.002	0.084–0.004

Примечание. По диагонали — разброс значений F_{ST} между сезонами географической субпопуляции, под диагональю — разброс значений F_{ST} между сезонами сравниваемых географических субпопуляций.

та в сезон 2019/2020. Для популяции юга Буреинского хребта неравновесными оказываются сборы сезона 2013/2014, который представлен наибольшим количеством локалитетов. Здесь резко падает частота аллеля 135 и появляется аллель 125. Для Сихотэ-Алинской субпопуляции неравновесной оказывается выборка сезона 2017/2018, характеризующаяся появлением аллеля 135. Для локуса *Mer041* в субпопуляциях Буреинского нагорья наблюдаемый недостаток гетерозигот, как правило, также незначителен, а большая часть сезонных географических выборок (10 из 14) показывает соответствие распределения генотипов соотношению Харди–Вайнберга (на уровне значимости 0.05). Иная картина наблюдается в Сихотэ-Алинской субпопуляции. Для сборов четырех сезонов (с 2012/2013 по 2017/2018) в районе р. Маном обнаружен значимый недостаток гетерозигот, приведший к отклонению от распределения Харди–Вайнберга. Можно предположить, что наблюдаемое отклонение определяется случайностью выявления аллелей при относительно небольших сезонных выборках и высоком аллельном разнообразии. Однако необъяснимо в таком случае почему оно затрагивает именно гетерозиготные генотипы, и более того, на р. Хар — в соседнем локалитете с р. Маном (сезон 2019/2020) при таком же аллельном разнообразии значимого недостатка гетерозигот не наблюдается.

В табл. 3 указан размах значений генетических дистанций, полученных на основе попарных сравнений — F_{ST} : для сезонных сборов каждой субпопуляции, для сезонных сборов субпопуляций Буреинского нагорья между собой и с субпопуляцией “Сихотэ-Алинь”. Минимальные показатели F_{ST} отражают нулевой уровень дифференциации сезонных сборов всех групп сравнений. F_{ST} для сравнения сезонных сборов различных географических субпопуляций Буреинского нагорья не превышают 0.051. При этом практически для всех таких сравнений не отвергается гипотеза нулевого уровня их дифференциации. Максимальные значения показателей генетической дифференциации сборов различных сезонов Сихотэ-Алинской субпопуляции (0.08) и попарных сравнений субпопуляций Буреинского нагорья с Сихотэ-Алинской субпопуляцией

(0.102–0.138) отражают достоверно отличный от нуля уровень их генетической дифференциации.

ОБСУЖДЕНИЕ

Высокий уровень аллельного разнообразия у соболей Сихотэ-Алиня [6], предполагающий их расселение в постледниковые из Сихотэ-Алинского лесного рефугиума, привлекает внимание к популяционной структуре обитателей левобережья Амура, территории первых шагов такого расселения. Результаты исследования биологического материала одного охотничьего сезона (2012/2013) показали, что вывод о более высоком уровне аллельного разнообразия соболей Сихотэ-Алиня верен и для сравнения субпопуляции западного макросклона Сихотэ-Алиня с субпопуляциями Буреинского нагорья [16]. Однако мониторинг восьми охотничьих сезонов периода 2011–2021 гг. обнаружил более сложную картину. При работе с материалом 2013–2021 гг. у соболей Буреинского нагорья в отдельные сезоны были выявлены редкие аллели (138, 142, 160 локуса *Mer041* и 125 локуса *Ma3*), в общем не изменяющие картины более высокого аллельного разнообразия Сихотэ-Алинской субпопуляции по сравнению с Буреинскими (табл. 2). Но обнаружены эти редкие аллели главным образом в субпопуляции “Маган”. Суммирование для каждой из субпопуляций данных по всем сезонам показывает сопоставимо высокое аллельное разнообразие в субпопуляциях “Маган”, автохтонной для соболей Буреинского нагорья и “Сихотэ-Алинь”, где возможна встреча трех форм — автохтонной Сихотэ-Алинской и двух интродуцированных. Уменьшение аллельного разнообразия в субпопуляциях “Сутырь” и “Каменушка” в сравнении с “Маган” возможно объясняется эффектом основателя при заселении соболей из Верхнебуреинского рассадника в более южные районы Буреинского нагорья.

Проведенный мониторинг показал, что Сихотэ-Алинскую субпопуляцию маркируют два уникальных аллеля — 129 локуса *Ma3* и 162 локуса *Mer041*. Эти аллели обнаружены здесь в выборках нескольких охотничьих сезонов с частотой встречаемости, достигающей до 0.07. Являются ли эти аллели оба, либо какой-нибудь из них характеристикой ав-

тохтонной популяции соболей Сихотэ-Алиня, либо занесены (занесен) во время интродукции соболей из Сибири – можно понять при сравнении со зверьками из Иркутской популяции. К сожалению, в нашем распоряжении подобного материала не было. Прямое сопоставление микросателлитных аллелей, полученных на различающейся приборной базе, практически невозможно, особенно для высокополиморфных локусов, к которым относится *Mer041*. Для наименее полиморфного локуса *Ma3* можно попытаться провести аналогию с ранее полученными данными. В промышленной популяции соболя было обнаружено четыре аллеля *Ma3* с диапазоном длин их спектра: 131, 133, 135, 137 [21]. У соболей Среднего Приамурья при работе в тех же условиях амплификации нами обнаружены четыре аллеля, определяемые на нашей приборной базе как 129, 131, 133, 135. Кроме того, здесь был обнаружен редкий аллель 125, длина которого на два повтора меньше самого короткого (129) из указанного спектра четырех. Вполне вероятно, что при исследовании промышленной популяции соболя и природных популяций Среднего Приамурья речь идет об одном и том же спектре четырех аллелей. Отсюда следует, что самый длинный аллель выявляемого нами спектра (135) идентичен аллелю 137, являющемуся уникальным для Сихотэ-Алинской популяции по данным С.Н. Каштанова с соавт. [6]. В таком случае характеристикой автохтонной популяции Сихотэ-Алиня является аллель 135. В настоящее время он включен в геном Буреинских и Сихотэ-Алинской субпопуляций. Аллель 129, обнаруженный нами в Среднем Приамурье только на Сихотэ-Алине, мог быть привнесен при интродукции соболей из Иркутской области. Конечно же, эта гипотеза требует инструментальной проверки. Однако если предположение верно, то аллель 129 более чем за полвека пребывания на правом берегу Амура не проник на левобережье, что подтверждает значимость Амура с прилегающей Средне-Амурской низменностью в качестве изолирующего эколого-географического барьера даже для активно и далеко мигрирующих соболей. Другим примером, иллюстрирующим подразделенность лево- и правобережных групп соболей, могли бы быть аллели 125 локуса *Ma3* и 142 локуса *Mer041*, встреченные только на Буреинском нагорье. За весь период исследования они обнаружены здесь только у одного либо двух зверьков. Подтверждение их приуроченности только к левобережью Амура требует проведения дальнейшего исследования.

Мониторинг аллельного состава микросателлитов в изучаемом охотниками материале представляет доступный источник информации о динамике генетической популяционной структуры этого природного промыслового вида в каждом из рассматриваемых географических районов ре-

гиона. Обнаружен различающийся характер динамики популяционной структуры соболя лево- и правобережья р. Амур. Проведенное исследование двух микросателлитных локусов в материале охотничьих сборов 11 лет показывает относительную однородность популяционной структуры соболя Буреинского нагорья, как правило, не приводящую к статистически значимому уровню дифференциации субпопуляций ни в пространстве, ни во времени. По контрасту с ней гетерогенность Сихотэ-Алинской субпопуляции выявляется по частотам аллелей двух рассматриваемых локусов, по количеству этих аллелей в сезонных сборах и постоянно определяемым неравновесным состоянием по локусу *Mer041* в локалитете “Маном”. Именно выявленная гетерогенность Сихотэ-Алинской субпопуляции определяет разброс генетических дистанций при сравнении сезонных сборов лево- и правобережья Амура от практически нулевых значений до промежуточного уровня дифференциации по Райту [22].

Существует множество факторов, приводящих к генетической гетерогенности во временных сборах в одной и той же популяции. Прежде всего это изменение численности, которое может быть обусловлено природными факторами, такими как динамика урожайности кедр, миграционной активностью, а также антропогенным давлением, в том числе промыслом соболя в конкретном районе обитания. Учитывая высокую подвижность соболей, можно предположить, что весомый вклад в изменение популяционной структуры мог быть внесен миграционной составляющей. Особенно вероятен такой процесс в районах, находящихся в шаговой доступности от человеческих поселений и потенциально подверженных в какие-то сезоны большой охотничьей активности, приводящей к освобождению мест для новых поселенцев – мигрантов с несколько отличающейся генетической структурой.

Наблюдаемая в локалитете “Маном” межсезонная гетерогенность аллельного состава может указывать на существование на склонах Сихотэ-Алиня пространственно неоднородной популяционной структуры, сформированной из потомков и возможных гибридов автохтонной и двух интродуцированных форм соболя. Предоставленный охотниками материал мог быть собран на стыке обитания этих форм, либо при неравномерном облове различающихся субпопуляций по сезонам. Другое объяснение предполагает возникновение гетерогенности от сезона к сезону за счет потоков мигрантов с различающейся генетической структурой на свободные территории, возможно появляющиеся в том числе в результате промысла.

Рассматриваемые микросателлитные маркеры являются показательными в исследовании дифференциации и мониторинге изменений в популяционной структуре соболя Среднего Приаму-

рья. Продолжение мониторинговых исследований, расширение района исследования и набора маркерных характеристик, как генетических, так и морфологических, позволит воссоздать полную картину эколого-генетических изменений во времени и пространстве.

Работа выполнена в рамках Госзадания ИКАРП ДВО РАН № 075-01570-22-00.

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балмышева Н.П., Соловчук Л.Л. Генетическая изменчивость гена цитохрома *b* митохондриальной ДНК соболя (*Martes zibellina* L.) магаданской популяции // Генетика. 1999. Т. 35. № 9. С. 1252–1257.
2. Петровская А.В. Генетическая структура популяций соболя (*Martes zibellina* L.) в Магаданской области по данным об изменчивости митохондриальной ДНК // Генетика. 2007. Т. 43. № 4. С. 530–536.
3. Рожнов В.В., Пищулина С.Л., Мецкерский И.Г. и др. Генетическая структура соболя (*Martes zibellina* L.) Евразии и анализ распределения митохондриальных линий // Генетика. 2013. Т. 49. № 2. С. 251–258.
4. Kinoshita Gohta, Sato J.J., Meschersky I.G. et al. Colonization history of the sable *Martes zibellina* (Mammalia, Carnivora) on the marginal peninsula and islands of northeastern Eurasia // J. Mammalogy. 2015. № 96(1). P. 172–184.
<https://doi.org/10.1093/jmamma/gyu021>
5. Каштанов С.Н., Свищева Г.Р., Лазебный О.Е. и др. Влияние антропогенных факторов на генетическое разнообразие вида соболя (*Martes zibellina* L.) // Мол. биология. 2015. Т. 49. № 3. С. 449–454.
<https://doi.org/10.7868/S002689841503009X>
6. Каштанов С.Н., Свищева Г.Р., Пищулина С.Л. и др. Географическая структура генофонда соболя (*Martes zibellina* L.): данные анализа микросателлитных локусов // Генетика. 2015. Т. 51. № 1. С. 78–88.
<https://doi.org/10.7868/S001667581501004X>
7. Каштанов С.Н., Столповский Ю.А., Мецкерский И.Г. и др. Таксономический статус и генетическая идентификация соболя Алтая (*Martes zibellina averini* Bazhanov, 1943) // Генетика. 2018. Т. 54. № 11. С. 1327–1337.
<https://doi.org/10.1134/S0016675818110073>
8. Монахов В.Г., Модоров М.В., Ранюк М.Н. Генетические последствия реинтродукции соболя (*Martes zibellina* L.) в Западной Сибири // Генетика. 2018. Т. 54. № 3. С. 361–365.
<https://doi.org/10.7868/S0016675818030098>
9. Монахов В.Г., Ранюк М.Н., Модоров М.В. Популяционная структура Байкальской горной страны. Анализ генетических и фенотипических характеристик // Экология. 2021. № 2. С. 143–152.
<https://doi.org/10.31857/S0367059721020074>
10. Крестов П.В., Баркалов В.Ю., Омелько А.М. и др. Реликтовые комплексы растительности современных рефугиумов северо-восточной Азии // Комаровские чтения. Владивосток: Дальнаука, 2009. Вып. 56. С. 5–63.
11. Абрамов К.Г. Соболи в охотничьем хозяйстве Дальнего Востока. М.: Наука, 1967. 116 с.
12. Sato J., Hosoda T., Kryukov A. et al. Genetic diversity of the sable (*Martes zibellina*, Mustelidae) in Russian Far East and Hokkaido inferred from mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 2 gene sequences // Mammal. Study. 2011. V. 36. P. 209–222.
13. Li B., Malyarchuk B., Ma Z. et al. Phylogeography of sable (*Martes zibellina* L. 1758) in the southeast portion of its range based on mitochondrial DNA variation: highlighting the evolutionary history of the sable // Acta Theriologica. 2013. V. 58. P. 139–148.
14. Голобокова О.А. История создания Верхнебуреинского соболиного племенного рассадника. 2017. URL: <https://komza.khabkrai.ru/Municipalnye-arhivy/Novosti-/890> (дата обращения: 22.11.2019).
15. Каплин А.А. Пушнина СССР. М.: Внешторгиздат, 1960. 464 с.
16. Фрисман Л.В., Шлюфман К.В., Брыкова А.Л. Генетическая структура популяций соболя Буреинского хребта по сборам одного охотничьего сезона // Региональные проблемы. 2019. Т. 22. № 4. С. 46–55.
<https://doi.org/10.31433/2618-9593-2019-22-4-46-55>
17. Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. № 22. P. 4692–4693.
18. Каштанов С.Н., Рубцова Г.А., Лазебный О.Е. Исследование генетической структуры промышленной популяции соболя (*Martes zibellina* Linnaeus, 1758) по микросателлитным маркерам // Вестник ВОГиС. 2010. Т. 14. № 3. С. 426–431.
19. Кузнецов В.М. F-статистика Райта: оценка и интерпретация // Проблемы биологии продуктивных животных. 2014. № 4. С. 80–104.
20. Excoffier L., Laval G., Schneider C. Arlequin. Ver 3.0. An integrated software package for population genetics data analysis // Evolutionary Bioinformatics Online. 2005. V. 1. P. 47–50.
21. Каштанов С.Н., Афанасьев К.И., Потанов С.Г., Лазебный О.Е. Микросателлитный анализ двух промышленных популяций соболя (*Martes zibellina* L.) // Генетика. 2011. Т. 47. № 12. С. 1622–1628.
22. Wright S. Evolution and Genetics of Population. V. 4. Variability Within and Among Natural Populations. Chicago: Univ. Chicago Press, 1978. 590 p.

Monitoring the Genetic Structure of the Sable Population (*Martes zibellina* Linnaeus, 1758) Middle Amur Region

L. V. Frisman^{a, *} and A. L. Brykova^a

^a*Institute for Complex Analysis of Regional Problems, Far East Branch
of the Russian Academy of Sciences, Birobidzhan, 679016 Russia*

**e-mail: l.frisman@mail.ru*

Based on the analysis of microsatellite loci *Ma3* and *Mer041*, the genetic structure of the sable population of the Middle Amur Region was monitored. Materials of hunting fees of winter seasons from 2011 to 2021 were studied. Three geographic subpopulations of sable from the Bureya Highlands and one from the eastern slopes of the Sikhote-Alin Ridge are considered. It was shown that the group of specific alleles characterizing the differences between the sable populations of the Bureya Highlands and the Sikhote-Alin is represented by four alleles. The monitoring of two microsatellite loci in the subpopulations of the Bureinsky Highlands showed a higher allelic diversity in the northern autochthonous compared to the more southern ones that arose on the basis of the settlement of the northern in the first half of the 20th century. The relative homogeneity of the population structure of the sable of the Bureinsky Highlands is shown, which does not lead to a statistically significant level of differentiation of subpopulations either in space or in time. A different character of the dynamics of allelic diversity was found in the subpopulations of the left bank (Bureya Highland) and right bank (Sikhote-Alin Ridge) of the Amur River. It has been hypothesized that temporal heterogeneity in the Sikhote-Alin subpopulation may indicate the existence on the eastern slopes of the Sikhote-Alin of a spatially heterogeneous population structure formed from descendants and possible hybrids of autochthonous and introduced forms. The influence of the anthropogenic factor on the dynamics of the genetic structure is considered.

Keywords: sable, microsatellites, allelic diversity, genetic differentiation, Bureya Upland, Sikhote-Alin Ridge.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНТРОГРЕССИЯ В ПОПУЛЯЦИЯХ ДВУХ БЛИЗКИХ ВИДОВ *Adalia frigida* (Schneider, 1792) И *Adalia bipunctata* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Coccinellidae) В ЗОНЕ СИМПАТРИИ

© 2023 г. Д. А. Романов¹, *, Е. В. Шайкевич¹, И. А. Захаров¹

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119333 Россия

*e-mail: dromanov_16@mail.ru

Поступила в редакцию 22.06.2022 г.

После доработки 15.09.2022 г.

Принята к публикации 20.09.2022 г.

Изучено гаплотипическое разнообразие мтДНК циркумполярного вида божьих коровок *Adalia frigida*, собранных в Якутске и Салехарде. На основе анализа нуклеотидных последовательностей гена *cox1* выявлено 18 митохондриальных гаплотипов, из них 14 новых. Из 18 гаплотипов *A. frigida* два (H32 и H9) являются наиболее распространенными. В районе Салехарда происходит перекрытие ареала *A. frigida* с ареалом другого близкого вида — *A. bipunctata*. Величина дивергенции по гену *cox1* между *A. frigida* и *A. bipunctata* достигает 4.1–4.3% и соответствует уровню различий, характерному для близких видов. Эти виды способны скрещиваться между собой, доля гибридных особей (*A. frigida* и *A. bipunctata*) в Салехарде составляет 56.5%. Гибридизация между *A. frigida* и *A. bipunctata* привела к взаимной митохондриальной интрогрессии, результатом которой стало приобретение гаплотипа H1 жуками *A. frigida* и гаплотипа H9 жуками *A. bipunctata*.

Ключевые слова: *Adalia frigida*, *Adalia bipunctata*, гибридизация, митохондриальная интрогрессия, полиморфизм мтДНК.

DOI: 10.31857/S0016675823040100, **EDN:** AWMQFP

Божьи коровки рода *Adalia* (Coleoptera: Coccinellidae) остаются популярным объектом для генетических (гибридологических и популяционных) исследований на протяжении уже почти 100 лет [1–6]. У представителей этого рода наиболее видное место среди таксономических признаков, по которым осуществляется определение видов, занимают окраска и рисунок различных частей тела — головы, переднеспинки, надкрылий, нижней стороны тела и ног. Однако рисунок надкрылий и переднеспинки этих жуков, особенно *A. bipunctata*, характеризуется высоким разнообразием. У светлых форм *A. bipunctata* надкрылья красные, обычно с одним черным пятном на каждом, реже с несколькими; у темных форм надкрылья обычно черные с двумя-тремя красными пятнами на каждом. Переднеспинка у светлых форм беловатая, обычно с черным пятном М-образной или трапециевидной формы, у темных форм — черная, с желтоватыми боками. Низ тела и ноги черные. *A. bipunctata* — голарктический вид, обитающий в Западной Европе, Северной Африке, в России (европейская часть, Кавказ, Сибирь, Дальний Восток), в Передней Азии, Закавказье, Казахстане, Средней Азии, Афганистане, Монголии, Китае, Японии, Северной Америке [2, 7, 8].

По краям ареала *A. bipunctata* встречаются резко различающиеся по фенотипу формы: *A. b. rev-elieri*, *A. b. turanica* и *A. b. fasciatopunctata*, которые первоначально рассматривали в качестве самостоятельных видов [9]. Однако гибридологический анализ [2] и сравнительный анализ мтДНК (ген *cox1*) и ядерной ДНК (ITS2 — второй внутренний транскрибируемый спейсер кластера рибосомных генов) показали, что эти формы являются географическими разновидностями одного вида — *A. bipunctata* [10, 11].

Для характеристики разнообразия гаплотипов у божьих коровок рода *Adalia* на протяжении 20 лет используется средняя часть гена *cox1* [12]. По выбранному участку уже описано 23 митохондриальных гаплотипа у *A. bipunctata* [13, 14]. Самым распространенным у *A. bipunctata* является гаплотип H1 [10, 12, 15].

Среди жуков рода *Adalia* наиболее близким видом к *A. bipunctata* является *A. frigida* [16]. У этого вида каждое надкрылье с двумя поперечными черными перевязями; передняя перевязь состоит из трех, задняя — из двух черных пятен, которые нередко полностью сливаются. Иногда пятна имеют светлую кайму. Такой рисунок никогда не встречается в европейских популяциях *A. bipunctata*. Перед-

неспинка с М-образным черным пятном посередине и часто с одной черной точкой у каждого бокового края. Реже переднеспинка черная, с узкой белой каймой вдоль боков. Низ тела и ноги черные, усики коричневые, с затемненной вершиной. Вышеописанный узор на надкрыльях *A. frigida* характерен только для этого вида. Этот рисунок наследуется как простой хромосомный аллель и используется как диагностический признак вида. *A. frigida* — циркумполярный вид, обитающий на Скандинавском полуострове (Норвегия, Швеция), севере европейской части России, севере и востоке Сибири, на севере Приморского края, Сахалине, Итурупе, Кунашире и в Северной Америке [7, 9, 17, 18].

Таксономическое положение *A. frigida* долгое время вызывало противоречивые заключения. Изначально описанный как отдельный вид *A. frigida* был лишен этого статуса американским энтомологом Ч.В. Лэнгом, который объединил его с *A. bipunctata* [19]. Этот взгляд на таксономическое положение *A. frigida* сохранился среди американских исследователей и в дальнейшем [20]. Таким образом, после объединения ранее описанного вида *A. annectans* с *A. bipunctata* [21] все разнообразие коровок рода *Adalia* в Северной Америке оказалось сведено к одному виду — *A. bipunctata*. В Европе же шли дискуссии о том, является ли *A. frigida* самостоятельным видом или же подвидом *A. bipunctata*. Я.Я. Лусис описал частичную репродуктивную изоляцию *A. frigida* и *A. bipunctata*, хотя ему удалось получить гибриды первого поколения, а нарушение процессов размножения он наблюдал лишь со второго поколения. Тем не менее он признал *A. frigida* самостоятельным видом [22]. Но некоторые исследователи рассматривали *A. frigida* в качестве подвида *A. bipunctata* [7, 17, 18, 23]. Проведенное ранее сравнение относительно небольшого количества образцов *A. frigida* с *A. bipunctata* по генетическим маркерам (*cox1* и ITS2) позволило предположить, что *A. frigida* имеет статус близкого к *A. bipunctata* вида [10, 11, 16].

Целями данного исследования было уточнение отношений между *A. frigida* и *A. bipunctata*, для чего было изучено разнообразие мтДНК *A. frigida* на территориях, где этот вид встречается совместно с *A. bipunctata* и где *A. frigida* является единственным представителем рода *Adalia*. Были проведены сборы жуков в Салехарде (2021 г.), в зоне совместного обитания *A. frigida* с *A. bipunctata*, и в Якутске (2015 г.), где встречается только *A. frigida*, и был выполнен анализ разнообразия последовательностей митохондриального гена *cox1* собранных жуков *A. frigida* и *A. bipunctata* в сравнении с ранее полученными последовательностями *A. frigida*, *A. bipunctata*, *A. tetraspilota*, *A. conglomerata* и *A. decempunctata*. Также выполнена проверка зараженности *A. frigida* и *A. bipunctata* из Салехарда и Якутска симбиотическими бактериями *Spiroplasma*, *Rickett-*

sia и *Wolbachia*, которые широко распространены в европейских популяциях *A. bipunctata*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В Якутске в 2015 г. было собрано 36 имаго *A. frigida*. В 2021 г. в Салехарде были собраны имаго *A. frigida* (23 экз.) и *A. bipunctata* (3 экз.). Определение видов кокцинеллид осуществляли визуально по характерному для каждого вида рисунку надкрылий жуков.

Выделение тотальной ДНК из имаго кокцинеллид проводили методом фенол-хлороформной экстракции по стандартному протоколу [24].

Реакцию амплификации с каждым препаратом ДНК проводили в объеме 25 мкл с использованием универсального набора Encyclo Plus PCR kit (Евроген, Россия, Москва) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Все ПЦР выполнялись на амплификаторе MiniAmp Plus (Applied Biosystems, США).

Для ПЦР на митохондриальный ген *cox1* применялись две пары праймеров: праймеры C1-jF (5'-GCTGGAATTTTCATCAATTTTAGG-3') и C1-nR (5'-GGAAATCAATGAATAAATCCTGCT-3'), подобранные к мтДНК *A. bipunctata*, а также универсальные праймеры LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') и HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') [25]. Праймеры LCO1490 и HCO2198 амплифицируют фрагмент *cox1* длиной 709 пн с позиции 20 по 728, а праймеры C1-jF и C1-nR амплифицируют фрагмент гена *cox1* длиной 737 пн с позиции 454 по 1190 (нумерация дана в соответствии с полной последовательностью митохондриального гена *cox1* *A. bipunctata* — GenBank ID: AJ313070). Условия амплификации (с праймерами C1-jF и C1-nR): начальная денатурация — 4 мин при 94°C; затем 35 циклов: денатурация — 20 с при 94°C, отжиг — 20 с при 58°C и полимеризация — 50 с при 72°C. ПЦР завершалась заключительной полимеризацией в течение 5 мин 72°C. Условия амплификации (с праймерами LCO1490 и HCO2198): начальная денатурация — 4 мин при 94°C; затем пять циклов: денатурация — 20 с при 94°C, отжиг — 20 с при 45°C и полимеризация — 45 с при 72°C; затем 30 циклов: денатурация — 20 с при 94°C, отжиг — 20 с при 55°C и полимеризация — 45 с при 72°C. ПЦР завершалась заключительной полимеризацией в течение 5 мин 72°C.

Определение зараженности божьих коровок *A. frigida* и *A. bipunctata* симбиотическими бактериями (*Spiroplasma*, *Rickettsia*, *Wolbachia*) проводили с помощью ПЦР со специфичными к генам бактерий праймерами. Для идентификации *Spiroplasma* по гену *dnaA* использовали праймеры Sp_ApDnaA_F1 (5'-ATTCTTCAGTAAAATGCTTGGA-3') и Sp_ApDnaA_R1 (5'-

Таблица 1. Митохондриальные гаплотипы *A. frigida* из Якутска

Гаплотип	GenBank ID	Тип мтДНК	Количество имаго	Обозначение образцов
H1	AJ313070	<i>A. bipunctata</i>	2/36	Y-19, Y-33
H9	AJ313067	<i>A. frigida</i>	7/36	Y-5, Y-7, Y-10, Y-18, Y-27, Y-28, Y-36
H25	ON025622	<i>A. frigida</i>	1/36	Y-16
H28	ON564977	<i>A. frigida</i>	1/36	Y-35
H29	ON564978	<i>A. frigida</i>	2/36	Y-23, Y-24
H30	ON564979	<i>A. frigida</i>	1/36	Y-3
H32	ON564980	<i>A. frigida</i>	18/36	Y-1, Y-4, Y-6, Y-8, Y-9, Y-14, Y-15, Y-17, Y-20, Y-21, Y-22, Y-25, Y-26, Y-29, Y-30, Y-31, Y-32, Y-34
H33	ON564981	<i>A. frigida</i>	2/36	Y-11, Y-12
H34	ON564982	<i>A. frigida</i>	1/36	Y-2
H35	ON564983	<i>A. frigida</i>	1/36	Y-13

АСАСАТТТАСТТКАТГСТАТТГА-3'), позволяющие амплифицировать фрагмент длиной 447 пн. Обнаружение *Rickettsia* осуществляли с применением праймеров RicF141 (5'-TCGGTTCTCTTTC-GGCATTTTA-3') и RicR548 (5'-GCATATTTAT-CAACGCTTCATT-3'), специфичных к последовательности гена *gltA*. Размер ПЦР-продукта составляет 407 пн. Поиск *Wolbachia* по гену *fbpA* проводили с праймерами fbpA-F1ms (5'-GCT-GCTCCACTTGGTATGAT-3') и fbpA-R1ms (5'-CCACCAGAAAAAACTACTATTC-3'), амплифицирующими фрагмент длиной 509 пн. Условия амплификации (для всех праймеров на бактерии): начальная денатурация — 4 мин при 94°C; затем 35 циклов: денатурация — 20 с при 94°C, отжиг — 20 с при 57°C и полимеризация — 35 с при 72°C. ПЦР завершалась заключительной полимеризацией в течение 5 мин 72°C.

Анализ результатов ПЦР осуществляли методом электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле. Элюцию фрагментов ДНК из геля проводили с использованием набора для выделения ДНК из агарозных гелей Cleanup Mini (Евроген, Москва) в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. Очищенные фрагменты ДНК передавали в компанию Евроген для секвенирования.

Хроматограммы нуклеотидных последовательностей фрагмента митохондриального гена *coxI* анализировали с помощью комплекта программ DNASTAR Lasergene 6 [26, 27]. Последовательности, полученные в результате секвенирования, зарегистрированы в базе данных GenBank под номерами ON025611–ON025630 и ON564976–ON564983.

Расчет генетических дистанций (по модели Кимуры) и создание филогенетических деревьев (методом Neighbor-Joining, эволюционная модель Кимуры) проводили в программе MEGA6 v6.0 [28].

Для построения дендрограммы представителей рода *Adalia* по митохондриальному гену *coxI* использовали базу данных GenBank. Из нее были выбраны все последовательности подходящего размера, общее число которых достигло 125. Затем провели отсев идентичных последовательностей: из группы одинаковых оставляли одну с сохранением упоминания о географическом происхождении отсеянных последовательностей. Количество оставшихся последовательностей уменьшилось до 33.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для изучения гаплотипического разнообразия мтДНК божьих коровок *A. frigida* и *A. bipunctata* были определены нуклеотидные последовательности средней части гена *coxI*. Все полученные новые последовательности были сравнены с ранее описанными 23 гаплотипами *A. bipunctata*.

У 36 имаго *A. frigida* из Якутска было обнаружено 10 митохондриальных гаплотипов, из них восемь новых (табл. 1). Поскольку некоторые гаплотипы, характерные для *A. frigida*, встречаются также и у *A. bipunctata*, для обозначения новых гаплотипов *A. frigida* была продолжена нумерация, использующаяся для обозначений гаплотипов *A. bipunctata*.

Наиболее распространенными гаплотипами у коровок в Якутске оказались H32, обнаруженный у 18 особей, и H9, найденный у семи особей. Последовательности H9 образуют отдельный кластер внутри группы гаплотипов *A. frigida* (рис. 1). Гаплотип H9, первоначально описанный у *A. bipunctata*, может свидетельствовать о митохондриальной интрогрессии от *A. frigida* к *A. bipunctata*, так как часто встречается именно у *A. frigida* (табл. 1). Интрогрессия митохондриальных геномов носи-

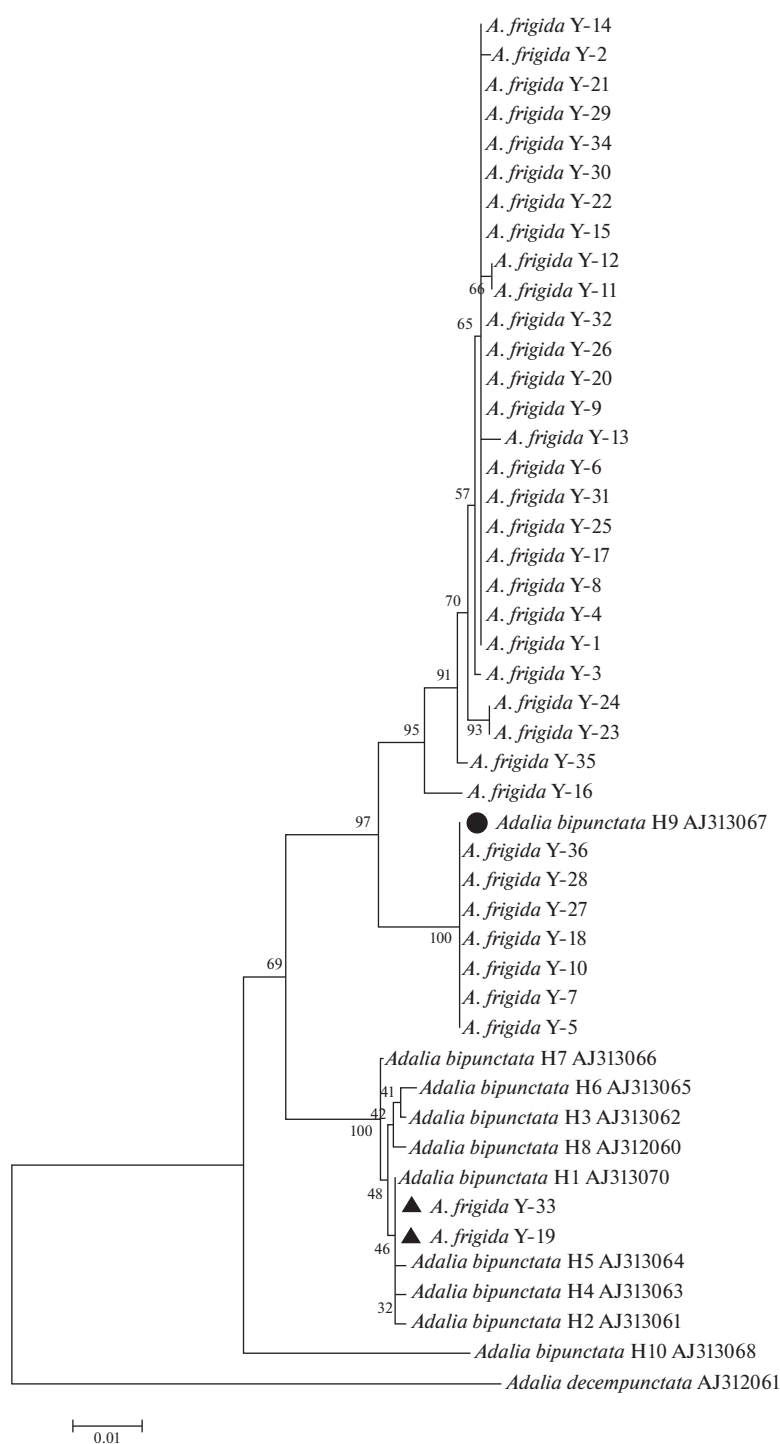


Рис. 1. Дендрограмма сходства нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *cox1* длиной 610 пн (с позиции 506 по 1115) божьих коровок *A. frigida*, собранных в Якутске (Y-1–Y-36), и *A. bipunctata*, представленных последовательно 10 митохондриальных гаплотипов (GenBank ID: AJ313060–AJ313070). События митохондриальной интрогрессии у *A. frigida* обозначены черными треугольниками, у *A. bipunctata* — черным кружком. Последовательность гена *cox1* *A. decempunctata* использована в качестве внешней группы.

ла взаимный характер, о чем свидетельствует обнаружение в Якутске двух имаго *A. frigida* с гаплотипом H1, который является самым распространенным гаплотипом *A. bipunctata* (рис. 1).

В Салехарде было собрано 26 имаго божьих коровок, ДНК была выделена из 23 из них, из которых 20 фенотипически (по рисунку надкрыльев) соответствовали *A. frigida*, а три — *A. bipunctata*.

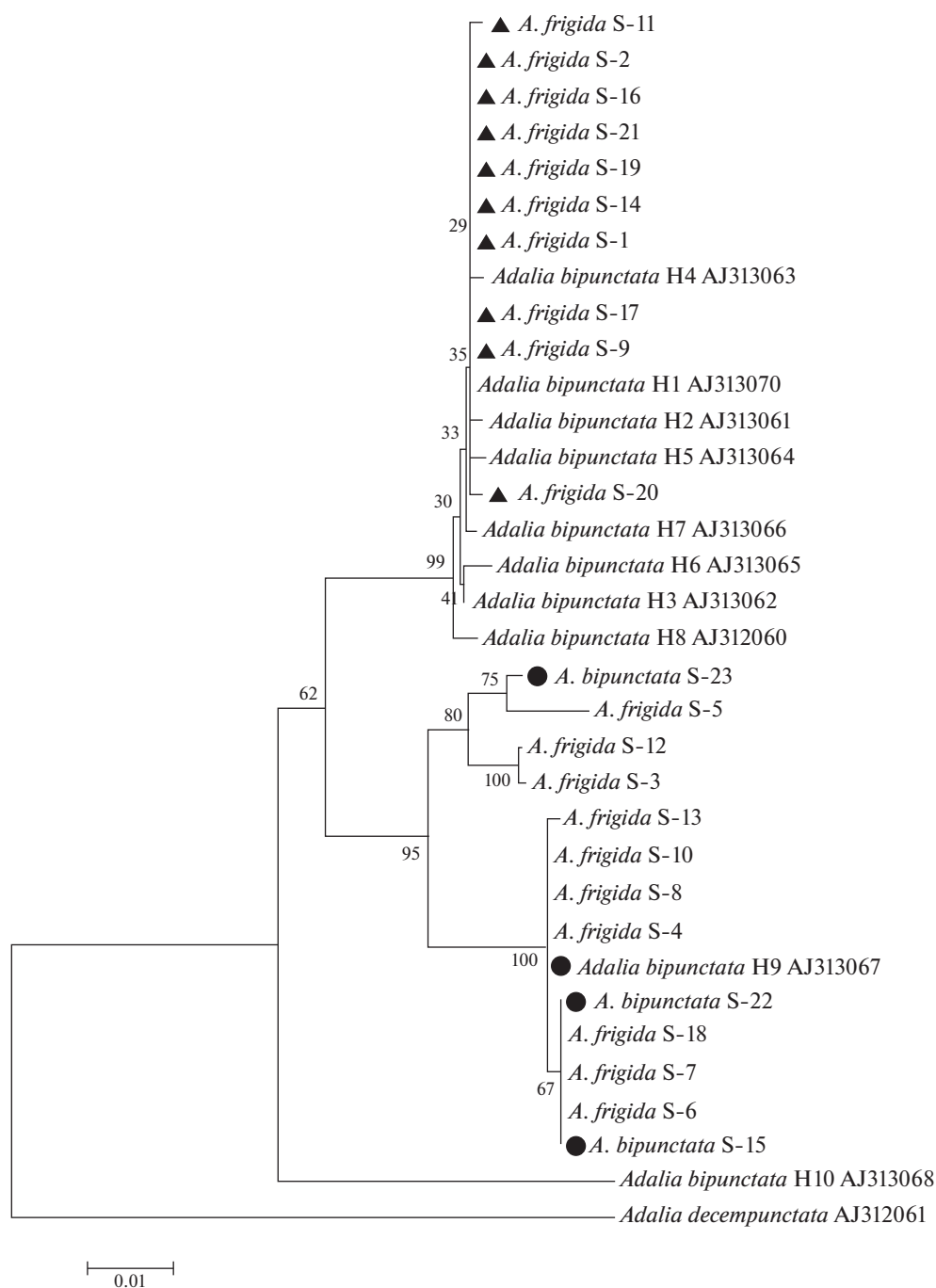


Рис. 2. Дендрограмма сходства нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *cox1* длиной 610 пн (с позиции 506 по 1115) божьих коровок *A. bipunctata* и *A. frigida*. Коровки, собранные в Салехарде (S-1–S-23), обозначены как *A. frigida* и *A. bipunctata* в соответствии с фенотипом. На дендрограмме также представлены последовательности 10 митохондриальных гаплотипов *A. bipunctata* (GenBank ID: AJ313060–AJ313070). События митохондриальной интрогрессии у *A. frigida* обозначены черными треугольниками, у *A. bipunctata* – черными кружками. Последовательность гена *cox1* *A. decempunctata* использована в качестве внешней группы.

Оказалось, что среди *A. frigida* 10 имаго имеют мтДНК своего вида, тогда как у других 10 имаго мтДНК соответствует мтДНК *A. bipunctata* (рис. 2). МтДНК всех трех особей *A. bipunctata* из Салехарда соответствует *A. frigida* (рис. 2).

Среди 20 имаго *A. frigida* из Салехарда было выявлено 11 митохондриальных гаплотипов, из них семь новых. У трех особей *A. bipunctata* обнаружены два новых гаплотипа: H27 и H38 (табл. 2).

Таблица 2. Митохондриальные гаплотипы *A. frigida* и *A. bipunctata* из Салехарда

Гаплотип	GenBank ID	Тип мтДНК	Количество имаго	Обозначение образцов
H1	AJ313070	<i>A. bipunctata</i>	8/23	S-1, S-2, S-9, S-14, S-16, S-17, S-19, S-21
H9	AJ313067	<i>A. frigida</i>	2/23	S-8, S-10
H19	KY765912	<i>A. bipunctata</i>	1/23	S-20
H24	ON025621	<i>A. bipunctata</i>	1/23	S-11
H25	ON025622	<i>A. frigida</i>	1/23	S-12
H26	ON025613	<i>A. frigida</i>	1/23	S-3
H27	ON564976	<i>A. frigida</i>	1/23	S-23
H31	ON025615	<i>A. frigida</i>	1/23	S-5
H36	ON025614	<i>A. frigida</i>	1/23	S-4
H37	ON025623	<i>A. frigida</i>	1/23	S-13
H38	ON025616 ON025617 ON025628	<i>A. frigida</i>	5/23	S-6, S-7, S-15 , S-18, S-22

Примечание. Полужирным шрифтом выделены образцы, фенотипически соответствующие *A. bipunctata*.

Образец S-4 отличается от образца S-10 единственной нуклеотидной заменой A225G, которая находится вне участка, выбранного для построения дендрограммы, поэтому на рис. 2 они идентичны, а в табл. 2 отнесены к разным гаплотипам (H36 и H9 соответственно). Последовательность гена *cox1* образца S-12 оказалась идентична полученной ранее последовательности *cox1 A. frigida* (JQ757049) из Архангельска [16], этот гаплотип обозначен как H25 (табл. 1). На рис. 1 и 2 последовательность JQ757049 отсутствует из-за недостаточной длины секвенированного участка (не хватает 61 пн для выравнивания с остальными последовательностями).

Мы рассчитали значения генетических дистанций между 17 гаплотипами, выявленными у *A. frigida* в Якутске и Салехарде (табл. 3). Различия между часто встречающимися гаплотипами мтДНК *A. frigida* (H9 и H32) и *A. bipunctata* (H1) составляет 4.1 и 4.3%. Разнообразие мтДНК *A. frigida* можно разделить на два кластера, один из которых образован гаплотипами H25–H35, другой образован гаплотипами H9–H38. Различия между гаплотипами внутри первого и второго кластеров составляет 0.2–1.9 и 0.2–0.3% соответственно. Различия между кластерами составляет от 2.3 до 3.1%.

Поскольку в многочисленных исследованиях для идентификации видов используется 5'-область гена *cox1*, мы выбрали восемь различающихся между собой образцов *A. frigida* из Салехарда (№ 1, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 13) (рис. 2) для проведения сравнительного анализа со всеми зарегистрированными в международной базе данных GenBank последовательностями божьих коровок рода *Adalia* (рис. 3).

Топология дендрограммы, построенной по 5'-области гена *cox1* (рис. 3), соответствует дендрограммам, построенным по средней части этого гена (рис. 1 и 2). Гаплотипы *A. bipunctata*, сходные с H1–H8, образуют один кластер, объединяющий варианты мтДНК собственно *A. bipunctata*. Множество гаплотипов *A. bipunctata* из Финляндии, Германии, Китая, Канады и США кластеризуются с мтДНК *A. frigida*. Последовательности 5'-области *cox1 A. frigida*, так же как и на рис. 1 и 2, разделяются на два кластера, что подтверждает достоверность такой топологии. Отдельно группируются гаплотипы, сходные с H10, а также последовательность *A. bipunctata* из Оулу, Финляндия, зарегистрированная под номером MZ659941.

Проведенный поиск симбионтов у 20 имаго *A. frigida* и трех имаго *A. bipunctata*, собранных в Салехарде, позволил выявить зараженность бактерией *Spiroplasma* у двух имаго *A. frigida* (S-5 и S-19). В Якутске *Spiroplasma* была найдена у трех имаго *A. frigida* (Y-11, Y-14 и Y-31). Бактерии *Rickettsia* и *Wolbachia* не были обнаружены.

ОБСУЖДЕНИЕ

Скрещивания двух разных видов могут привести к митохондриальной интрогрессии — замене собственной митохондриальной ДНК (мтДНК) у одного вида на мтДНК другого вида. С развитием молекулярно-генетических методов анализа количество работ, посвященных событиям интрогрессии, стало неуклонно расти [29]. Такие процессы происходят не только между разными видами [30–32], но и между близкими родами [33].

Таблица 3. Значения генетических дистанций между последовательностями митохондриальных гаплотипов, обнаруженных у *A. frigida*

№	Гаплотип	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	H1																
2	H24	0.002															
3	H25	0.037	0.039														
4	H26	0.039	0.041	0.002													
5	H27	0.036	0.037	0.013	0.014												
6	H28	0.039	0.041	0.013	0.014	0.006											
7	H29	0.044	0.046	0.014	0.016	0.010	0.006										
8	H30	0.043	0.044	0.013	0.014	0.006	0.003	0.006									
9	H31	0.048	0.049	0.018	0.019	0.011	0.008	0.011	0.005								
10	H32	0.043	0.044	0.013	0.014	0.008	0.005	0.002	0.006	0.006							
11	H33	0.044	0.046	0.014	0.016	0.010	0.006	0.003	0.006	0.008	0.002						
12	H34	0.044	0.046	0.014	0.016	0.010	0.006	0.003	0.006	0.008	0.002	0.003					
13	H35	0.046	0.048	0.016	0.018	0.011	0.008	0.005	0.003	0.010	0.003	0.005	0.005				
14	H9	0.041	0.043	0.026	0.024	0.026	0.023	0.027	0.026	0.027	0.026	0.027	0.027	0.029			
15	H36	0.041	0.043	0.026	0.024	0.026	0.023	0.027	0.026	0.027	0.026	0.027	0.027	0.029	0.000		
16	H37	0.043	0.044	0.027	0.026	0.027	0.024	0.029	0.027	0.029	0.027	0.029	0.029	0.031	0.002	0.002	
17	H38	0.043	0.044	0.027	0.026	0.027	0.024	0.029	0.027	0.029	0.027	0.029	0.029	0.031	0.002	0.002	0.003

Примечание. Размер анализируемого участка составляет 633 пн.



Рис. 3. Дендрограмма сходства нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *coxI* длиной 537 пн (с позиции 85 по 621) божьих коровок рода *Adalia*. Коровки, собранные в Салехарде, отмечены черными ромбами. Последовательности, взятые из базы данных GenBank, приведены с указанием их регистрационных номеров и стран, в которых они были отмечены, а также с указанной авторами видовой принадлежностью. Квадратные скобки объединяют группы гаплотипов, относящихся к *A. bipunctata* и *A. frigida*. Последовательность гена *coxI* *Harmonia quadripunctata* использована в качестве внешней группы.

В лабораторных условиях Я.Я. Лусис получал гибриды от скрещивания *A. bipunctata* с *A. frigida* [2, 22]. По нашим данным (результаты не пред-

ставлены) фенотип *A. frigida*, имеющий характерный для этого вида рисунок из двух полос на надкрыльях, является рецессивным по отношению к

Таблица 4. Распространенность и частота встречаемости гаплотипа Н9 у *A. bipunctata*

Страна	Город	Всего образцов	Из них Н9	Источник
Англия	Кембридж	3	2	[12]
Норвегия	Альта	26	4	[13]
Дания	Рибе	2	1	[12]
Германия	Билефельд	16	3	[12]
Россия	Архангельск	20	4	[35]
	Санкт-Петербург	4	2	[12]
	Санкт-Петербург	34	1	[15]
	Москва	22	1	[12]
Армения	Ереван	12	2	[10]

обычным рисункам *A. bipunctata* и определяется аллелем того же гена, что и другие рисунки надкрылий. Проведенный нами сравнительный анализ мтДНК (рис. 1, 2) выявил множество случаев, когда у одного вида обнаруживается мтДНК другого вида. Это указывает на то, что гибридизация между этими видами происходит и в природных популяциях. Коровки *A. bipunctata* ведут относительно оседлый образ жизни, мигрируя по небольшой территории в поисках пищи либо мест для зимовки [3]. Коровки *A. frigida*, вероятно, ведут себя сходным образом. Поскольку гаплотип Н9, соответствующий мтДНК *A. frigida*, был обнаружен в ряде мест, где *A. frigida* не встречается: в Англии, Дании, Германии, России (Москва, Санкт-Петербург), Армении (табл. 4), а гаплотип Н1 был найден в Якутске, где не обитает *A. bipunctata*, их носителями могли быть лишь потомки от межвидовых гибридов. Это свидетельствует о возникновении взаимной митохондриальной интрогрессии. Для объяснения широкого распространения гаплотипа Н9 можно предположить, что ранее *A. frigida* обитал на обширной территории, где неоднократно происходила гибридизация двух видов, либо что *A. bipunctata* приобрел гаплотип Н9 однократно, а затем носители этого гаплотипа расселились очень широко по современному ареалу вида.

Хотя *A. frigida* сравнительно недавно считался циркумполярным видом, мы предполагаем, что к настоящему времени ареал этого вида значительно сократился. Во время сборов кокциnellид на севере Норвегии в 2016 г. И.А. Захаровым был обнаружен только один вид — *A. bipunctata* [5]. *A. frigida* отмечался на севере Швеции как редкий вид божьих коровок и был внесен в список Красной книги Швеции в 2000–2005 гг. С 2010 г. *A. frigida* перестал упоминаться в Красной книге Швеции, которая переиздается каждые 5 лет [34]. В Архангельске *A. frigida* присутствовал еще в 2005 г., но уже с 2010 г. там удается найти лишь *A. bipunctata* [16, 35]. Я.Я. Лусис со ссылкой на американские

работы 1903–1910 гг. указывает, что *A. frigida* в Северной Америке распространяется на юг до Огайо, Канзаса, Миссури и Небраски [2]. Однако в Канаде и в США (Аляска) в ходе выполнения работ по проектам, направленным на изучение биоразнообразия членистоногих [36, 37], вид *A. frigida*, в отличие от *A. bipunctata* (рис. 3), не был отмечен. К сожалению, американские исследователи часто считали *A. frigida* синонимом *A. bipunctata* [20]. Так что отсутствие упоминания о *A. frigida* и выявление множества митохондриальных гаплотипов этого вида у *A. bipunctata* в Северной Америке может означать как исчезновение *A. frigida* и интрогрессию мтДНК этого вида, так и объединение *A. frigida* с *A. bipunctata* при сборах. В Европе ареал *A. frigida* сокращается, вероятно, в связи с глобальным потеплением. Та же причина способствует продвижению *A. bipunctata* в северном и северо-восточном направлениях. Обживая новые территории, жуки *A. bipunctata* скрещиваются с *A. frigida*, что приводит к поглощению вида *A. frigida* более активным в условиях потепления *A. bipunctata*. *A. frigida* пока сохранился на севере России и в Сибири, но значительная часть оставшегося ареала представляет собой зону гибридизации с *A. bipunctata*.

Салехард находится как раз в зоне гибридизации этих видов божьих коровок. Несмотря на то что *A. frigida* численно преобладает над *A. bipunctata* (в соотношении 23 : 3), половина особей *A. frigida* имеет мтДНК *A. bipunctata*, а у всех собранных здесь имаго *A. bipunctata* найдена мтДНК *A. frigida*, что свидетельствует об активно идущей гибридизации. Доля гибридов составляет 56.5% от числа особей *A. frigida* и *A. bipunctata*. В Якутске, находящемся вне зоны гибридизации, частота митохондриальной интрогрессии у *A. frigida* невелика — 5.5%. Очевидно, что два имаго *A. frigida*, у которых был найден гаплотип Н1, представляют собой потомков от скрещивания с самками *A. frigida* из южнее расположенной гибридной зоны.

Анализируя дендрограммы (рис. 1–3), мы отмечаем разделение разнообразия гаплотипов *A. frigida* на два кластера. Учитывая, что один кластер (гаплотипы Н25–Н35) достигает наибольшего разнообразия и наибольшей частоты распространения в Якутске, а другие входящие в него гаплотипы (с учетом данных по *A. bipunctata*) найдены в Китае, Канаде и США, можно предположить, что он характеризует полиморфизм мтДНК сибирских популяций *A. frigida*. Второй кластер, образуемый гаплотипами Н9, Н36, Н37 и Н38, наоборот, более разнообразен в Салехарде, что позволяет предполагать его европейское происхождение. Однако контакты между европейскими и сибирскими популяциями *A. frigida* привели к обобществлению гаплотипов из обоих кластеров и дальнейшему распространению их на новые территории. Дивергенция между нуклеотидными последовательностями гаплотипов из этих кластеров, достигающая 2.3–3.1%, находится между средними значениями генетических расстояний (%), рассчитанных для полиморфизма внутри вида (0.89 ± 0.16) и для полиморфизма между близнецовыми видами и подвидами (3.78 ± 1.18) [38]. Такие значения вполне могут характеризовать разницу между отдаленными популяциями одного вида.

Вопрос о таксономическом статусе *A. frigida* и *A. bipunctata* дискутировался долгое время. Величина дивергенции по митохондриальному гену *cox1* у этих коровок достигает 4.1–4.3%, что характеризует уровень различий между подвидами либо близкими видами [38]. Способность *A. frigida* и *A. bipunctata* скрещиваться между собой и то, что их потомки (или часть из них) фертильны, указывает на подвидовой уровень. Однако в последнее время количество свидетельств межвидовых и межродовых гибридизаций неуклонно растет [30, 31, 33], что несколько снижает требования к строгой репродуктивной изоляции между разными видами. Другим близким к *A. bipunctata* видом является *A. tetraspilota*, встречающийся в Узбекистане, Индии, Непале [2]. Этот вид репродуктивно изолирован от *A. bipunctata* [2], а величина дивергенции между *A. tetraspilota* и *A. bipunctata* по последовательностям *cox1* (6.2%) и ITS2 (1.8%) сходна с наблюдаемой для *A. frigida* и *A. bipunctata* (4.9 и 1.8% соответственно) [16]. Это позволяет предположить, что генетические расстояния, отмечаемые для пар *A. bipunctata*–*A. frigida* и *A. bipunctata*–*A. tetraspilota*, отражают видовой уровень дивергенции для коровок рода *Adalia*.

У *A. bipunctata* известен еще один случай митохондриальной интрогрессии от неизвестного близкого вида божьих коровок, который привел к появлению гаплотипа Н10 от гаплотипов, типичных для *A. bipunctata*, составляет 6.7% [16]. Гаплотип Н10 распространился на значительной части ареала *A. bipunctata* — от Германии до Бурятии (Россия)

[16], родственные ему гаплотипы присутствуют также в США и Канаде (рис. 3). Тем не менее у *A. frigida* этого гаплотипа не обнаружено. Предполагается, что *A. bipunctata* приобрел этот гаплотип уже после дивергенции с *A. frigida* от пока неизвестного, возможно исчезнувшего, вида [16].

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 22-24-00435.

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лус Я.Я. О наследовании окраски и рисунка у божьих коровок *Adalia bipunctata* L. и *Adalia decempunctata* L. // Изв. Бюро по генетике. 1928. Т. 6. С. 89–163.
2. Лусис (Лус) Я.Я. Таксономические отношения и географическое распространение форм жуков рода *Adalia* Mulsant // Уч. записки Латв. гос. ун-та: Проблемы генетики и эволюции. 1973. Т. 184. № 1. С. 5–128.
3. Сергиевский С.О., Захаров И.А. Изучение генетического полиморфизма популяций двуточечной божьей коровки *Adalia bipunctata* (L.) Ленинградской области. II. Состав популяции города Ленинграда // Генетика. 1983. № 4. С. 635–640.
4. Honek A., Martinková Z., Pekár S. Temporal stability of morph frequency in central European populations of *Adalia bipunctata* and *A. decempunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) // Eur. J. Entomol. 2005. V. 102. P. 437–442.
<https://doi.org/10.14411/eje.2005.062>
5. Захаров И.А., Рубанович А.В. Экологическая генетика жуков рода *Adalia*: популяции *A. bipunctata* Норвегии и Кольского полуострова // Экол. генетика. 2018. Т. 16. № 1. С. 49–52.
<https://doi.org/10.17816/ecogen16149-52>
6. Шайкевич Е.В., Захаров И.А., Хонек А. Экологическая генетика жуков рода *Adalia*: изменчивость и симбиотические бактерии в европейских популяциях десятиточечной божьей коровки *Adalia decempunctata* // Экол. генетика. 2019. Т. 17. № 4. С. 37–45.
<https://doi.org/10.17816/ecogen17437-45>
7. Кузнецов В.Н. Сем. Coccinellidae — Божьи коровки // Определитель насекомых Дальнего Востока СССР. Т. 3. Жесткокрылые, или жуки. Ч. 2. Л.: Наука, 1991. С. 333–376.
8. Никитский Н.Б., Украинский А.С. Божьи коровки (Coleoptera, Coccinellidae) Московской области // Энтомол. обозрение. 2016. Т. 45. № 3. С. 555–582.
<https://doi.org/10.1134/S0013873816060051>
9. Якобсон Г.Г. Жуки России и Западной Европы. Вып. XIII. Петроград: Девриен, 1916. С. 981–984.
10. Захаров И.А., Шайкевич Е.В. Молекулярно-генетическое изучение географических форм жуков *Ada-*

- lia bipunctata* и *A. frigida* // Экол. генетика. 2014. Т. 12. № 3. С. 52–59.
<https://doi.org/10.17816/ecogen12352-59>
11. *Shaikevich E.V., Zakharov I.A.* Biodiversity in geographically remote natural populations of *Adalia* ladybirds (Coleoptera: Coccinellidae) // Beetles: Biodiversity, Ecology and Role in the Environment. N.Y.: Nova Sci. Publ., Inc., 2015. P. 205–227.
 12. *Schulenburg J.H.G., Hurst G.D.D., Tetzlaff D. et al.* History of infection with different male-killing bacteria in the two-spot ladybird beetle *Adalia bipunctata* revealed through mitochondrial DNA sequence analysis // Genetics. 2002. V. 160. № 3. P. 1075–1086.
<https://doi.org/10.1093/genetics/160.3.1075>
 13. *Паленко М.В., Андрианов Б.В., Романов Д.А., Захаров И.А.* Географический клинальный полиморфизм распределения митохондриальных гаплотипов *Adalia bipunctata* Linnaeus, 1758 (Coleoptera: Coccinellidae) Норвегии // Генетика. 2018. Т. 54. № 4. С. 456–461.
 14. *Shaikevich E.V., Romanov D.A., Zakharov I.A.* The diversity of *Wolbachia* in a single *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) population: Correlations with host phylogeny and male-killing // Symbiosis. 2021. V. 85. № 2. P. 249–257.
<https://doi.org/10.1007/s13199-021-00808-x>
 15. *Захаров И.А., Шайкевич Е.В.* Полиморфизм мтДНК в петербургской популяции *Adalia bipunctata* и его связь с зараженностью симбиотической бактерией *Spiroplasma* // Экол. генетика. 2011. Т. 9. № 1. С. 27–31.
 16. *Zakharov I.A., Shaikevich E.V.* Comparative study of mtDNA in species of the genus *Adalia* (Coleoptera: Coccinellidae) and origin of ancient mitochondrial haplotypes in the gene pool of *Adalia bipunctata* // Eur. J. Entomol. 2013. V. 110. № 3. P. 427–433.
<https://doi.org/10.14411/eje.2013.057>
 17. *Кузнецов В.Н., Прощалькин М.Ю.* К фауне жуков-кокциеллид (Coleoptera, Coccinellidae) Курильских островов // Евразийский энтомол. журн. 2006. Т. 5. № 4. С. 264–270.
 18. *Кузнецов В.Н., Прощалькин М.Ю.* Фауна жуков-кокциеллид (Coleoptera, Coccinellidae) острова Сахалин // Евразийский энтомол. журн. 2007. Т. 6. № 1. С. 39–50.
 19. *Leng C.W.* Notes on Coccinellidae. II // J. N.Y. Entomol. Soc. 1903. V. 11. P. 193–213.
 20. *Belicek J.* Coccinellidae of Western Canada and Alaska with analyses of the transmontane zoogeographic relationships between the fauna of British Columbia and Alberta (Insecta: Coleoptera: Coccinellidae) // Quaestiones Entomologicae. 1976. V. 12. P. 283–409.
 21. *Palmer M.A.* Some notes on heredity in the coccinellid genus *Adalia* Mulsant // Ann. Entomol. Soc. Amer. 1911. V. 4. P. 283–302.
 22. *Лусис (Лус) Я.Я.* О систематическом положении *Adalia frigida* Schneider (Coleoptera, Coccinellidae) // Генетико-селекционные исследования в Латвийской ССР: Тез. докл. конф. Рига: Зинатне, 1976. С. 3–6.
 23. *Iablokoff-Khnzorian S.M.* Les coccinelles. Coléoptères–Coccinellidae. Paris: Société nouvelle des Editions Boubée, 1982. 568 p.
 24. *Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1626 p.
 25. *Folmer O., Black M., Hoeh W. et al.* DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 1994. V. 3. P. 294–299.
 26. *Clewley J.P.* Macintosh sequence analysis software. DNASTAR's Lasergene // Mol. Biotechnol. 1995. V. 3. P. 221–224.
<https://doi.org/10.1007/BF02789332>
 27. *Burland T.G.* DNASTAR's Lasergene sequence analysis software // Methods Mol. Biol. 2000. V. 132. P. 71–91.
<https://doi.org/10.1385/1-59259-192-2:71>
 28. *Tamura K., Stecher G., Peterson D. et al.* MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 // Mol. Biol. Evol. 2013. V. 30. № 12. P. 2725–2729.
<https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
 29. *Toews D.P.L., Brelsford A.* The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals // Mol. Ecol. 2012. V. 21. № 16. P. 3907–3930.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05664.x>
 30. *Dias C., Lima K.A., Araripe J. et al.* Mitochondrial introgression obscures phylogenetic relationships among manakins of the genus *Lepidothrix* // Mol. Phylogenet. Evol. 2018. V. 126. P. 314–320.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.04.017>
 31. *Crottini A., Orozco-terWengel P., Rabemananjara F.C.E. et al.* Mitochondrial introgression, color pattern variation, and severe demographic bottlenecks in three species of Malagasy poison frogs, genus *Mantella* // Genes. 2019. V. 10. № 4. P. 317:1–25.
<https://doi.org/10.3390/genes10040317>
 32. *Horoïwa M., Mandagi I.F., Sutra N. et al.* Mitochondrial introgression by ancient admixture between two distant lacustrine fishes in Sulawesi Island // PLoS One. 2021. V. 16. № 6. e0245316.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245316>
 33. *Shapoval N.A., Yakovlev R.V., Kuftina G.N. et al.* Identification of natural hybrids between *Ahlbergia frivaldszkyi* (Lederer, 1853) and *Callophrys rubi* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera, Lycaenidae) using mitochondrial and nuclear markers // Insects. 2021. V. 12. P. 1124:1–16.
<https://doi.org/10.3390/insects12121124>
 34. Artfakta. Naturvård. Polarnyckelpiga. 2022. <https://artfakta.se/naturvard/taxon/adalia-frigida-105674>
 35. *Шайкевич Е.В., Ившина Е.В., Захаров И.А.* Полиморфизм митохондриальной ДНК и распространение цитоплазматических симбионтов в популяциях двуточечной божьей коровки *Adalia bipunctata* // Генетика. 2012. Т. 48. № 5. С. 666–671.
 36. *Woodcock T.S., Boyle E.E., Roughley R.E. et al.* The diversity and biogeography of the Coleoptera of Churchill: insights from DNA barcoding // BMC Biology. 2013. V. 13. P. 40:1–15.
<https://doi.org/10.1186/1472-6785-13-40>
 37. *Sikes D.S., Bowser M., Morton J.M. et al.* Building a DNA barcode library of Alaska's non-marine arthropods. Fairbanks: Univ. Alaska Museum, 2017. 38 p.
<https://doi.org/10.1139/gen-2015-0203>
 38. *Картавцев Ю.Ф.* Генетическая дивергенция видов и других таксонов, географическое видообразование и генетическая парадигма неодарвинизма в действии // Успехи соврем. биологии. 2013. Т. 133. № 5. С. 419–451.

Genetic Introgression in Populations of Two Related Species *Adalia frigida* (Schneider, 1792) and *Adalia bipunctata* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Coccinellidae) in the Zone of Sympatry

D. A. Romanov^{a, *}, E. V. Shaikevich^a, and I. A. Zakharov^a

^aVavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences, Moscow, 119333 Russia

*e-mail: dromanov_16@mail.ru

The haplotype diversity of mtDNA of the circumpolar species of ladybirds *Adalia frigida* collected in Yakutsk and Salekhard was studied. Based on the analysis of the nucleotide sequences of the *coxI* gene, 18 mitochondrial haplotypes were identified, of which 14 were new. Of the 18 haplotypes of *A. frigida*, two (H32 and H9) are the most common. In the Salekhard region, the range of *A. frigida* overlaps with that of another closely related species, *A. bipunctata*. The value of divergence in the *coxI* gene between *A. frigida* and *A. bipunctata* reaches 4.1–4.3% and corresponds to the level of differences characteristic of closely related species. These species are able to interbreed, the share of hybrid individuals (*A. frigida* and *A. bipunctata*) in Salekhard is 56.5%. Hybridization between *A. frigida* and *A. bipunctata* led to mutual mitochondrial introgression, which resulted in the acquisition of the H1 haplotype by the *A. frigida* beetles and the H9 haplotype by the *A. bipunctata* beetles.

Keywords: *Adalia frigida*, *Adalia bipunctata*, hybridization, mitochondrial introgression, mtDNA polymorphism.

ИНФОРМАТИВНОСТЬ 11 МИКРОСАТЕЛИТНЫХ ЛОКУСОВ ДЛЯ ЭКСПЕРТНОЙ ДНК-ИДЕНТИФИКАЦИИ ДИКИХ И ФЕРМЕРСКИХ НОРОК АМЕРИКАНСКИХ (*Mustela vison*) В БЕЛАРУСИ

© 2023 г. О. Н. Лукашкова¹ *, Е. А. Спивак¹, С. А. Котова¹

¹Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз
Республики Беларусь, Минск, 220114 Республика Беларусь

*e-mail: l22805@tut.by

Поступила в редакцию 30.06.2022 г.

После доработки 24.08.2022 г.

Принята к публикации 30.08.2022 г.

Норка американская включена в хозяйственно-экономическую деятельность Республики Беларусь, относится к ресурсным охотничьим видам, а также разводится на зверофермах для производства пушнины. Для расследования случаев незаконного промысла и хищений зверьков ради ценного меха нами предложена идентифицирующая тест-система из 11 микросателлитных локусов ДНК. Информативность тест-системы исследована на двух выборках фермерских норок и выборке из территориально удаленной от зверохозяйств дикой популяции *Mustela vison*. Показано, что между дикими и фермерскими норками имеются значимые генетические различия ($F_{st} = 0.04397$, $P < 0.005$), а вероятности случайного совпадения 11-локусных генотипов, рассчитанные с учетом и без учета коэффициента F_{st} , различаются на два порядка (1.84×10^{-8} и 1.39×10^{-10} соответственно). В разрезе криминалистического ДНК-анализа это требует формирования референтных баз данных для каждой из двух групп — отдельной базы для диких животных и отдельной базы для животных, разводимых в фермерских хозяйствах.

Ключевые слова: американская норка, ДНК-маркеры, идентификация, генетическое разнообразие, частоты аллелей, референтная база данных.

DOI: 10.31857/S0016675823040069, **EDN:** AVXYCL

Американская норка *Neovison vison* Schreber, 1777 (syn.: *Mustela vison*, *Neogale vison*) — полуводный хищник семейства Куны, естественный ареал которого занимает большую часть Северной Америки. В Европу этот вид был завезен в начале XX в., прежде всего для разведения на звероводческих фермах с целью получения меха.

Вселение и акклиматизация норки американской на территории Беларуси началась в 1953 г., и в течение последующих пяти лет в различные водные экосистемы страны было выпущено более 800 американских норок, которые со временем расселились почти повсеместно и дали начало современной дикой популяции [1]. По данным Министерства лесного хозяйства Республики Беларусь по состоянию на 2021 г. численность этого нового для нашей фауны вида составляет 24475 особей [2].

Кроме того, американская норка разводится в зверохозяйствах для получения пушно-мехового сырья, при этом в настоящее время у белорусских производителей клеточной пушнины в разведении преобладают породы скандинавской норки, шкурки которых пользуются повышенным спросом.

Таким образом, можно констатировать, что в Беларуси популяция американской норки представлена двумя искусственно изолированными друг от друга сообществами (или субпопуляциями): 1) дикими животными, завезенными с целью развития охотничьего промысла и имеющими самостоятельную историю расселения и естественное воспроизводство, и 2) “домашними” (фермерскими), включающими зверьков, происходящих от близкородственных маточных стад и содержащихся в неволе на зверофермах, при разведении которых используются специальные селекционные программы. С учетом результатов исследования А.А. Valnisty et al. [3], в котором было установлено, что мигранты с норковых ферм не вносят существенного вклада в генофонд дикой популяции, можно ожидать, что каждое из этих двух изолированных сообществ будет иметь специфичную популяционно-генетическую структуру.

Применительно к экспертному ДНК-анализу при необходимости идентификации образцов тканей от незаконно добытых или похищенных норок для достоверного сравнения генотипов образцов,

относящихся к одной из двух групп (дикой или домашней), наиболее целесообразно использовать соответствующие ей частоты аллелей для расчета вероятности случайного совпадения генотипов (*MP*, Match Probability) [4]. Расчет *MP* проводится на основе референтных баз данных, содержащих сведения о частотах встречаемости аллелей идентифицирующих ДНК-маркеров в исследованных популяциях. В конечном счете достоверность и сила индивидуальной идентификации будут зависеть от наличия репрезентативной базы данных и информативности использованной панели локусов.

Исследования американской норки в контексте экспертной ДНК-идентификации в Республике Беларусь ранее не проводились. В связи с этим нашей целью была разработка эффективной и надежной криминалистической панели на основе ДНК-маркеров, обладающих достаточным уровнем полиморфизма и высокой разрешающей способностью при проведении идентификационных исследований биологических образцов животных вида *Mustela vison*. В ходе разработки решались задачи по отбору кандидатных маркерных локусов, формированию на их основе мультилокусной тест-системы для генотипирования и определению стандартных популяционно-статистических показателей, характеризующих идентификационный потенциал тест-системы. Для обоснования подходов к формированию референтных баз данных и проведению вероятностных расчетов особенности распределения частот аллелей исследованных локусов изучали в двух группах животных: диких, происходящих из свободно живущей дикой популяции, и домашних, происходящих из двух фермерских зверохозяйств. Дикая выборка преимущественно включала образцы норки из гомельской популяции, географически максимально удаленной от звероферм, являвшихся источником образцов в домашней выборке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы биологического материала и выделение ДНК

Коллекция биологического материала ($N = 101$) была представлена образцами животных из природных популяций *M. vison* Гомельской ($N = 19$), Гродненской ($N = 1$), Минской ($N = 2$) и Витебской ($N = 2$) областей и образцами разводимых в неволе животных из двух зверохозяйств: Молодечненского сельскохозяйственного отделения производственного унитарного предприятия “Белкоопмех”, Минская область ($N = 27$); зверохозяйства торгового унитарного предприятия “Белкоопвнешторг Белкоопсоюза”, Гродненская область ($N = 50$).

Микросателлитные локусы

Микросателлитные (или STR) локусы отбирали на основании анализа литературных данных, в которых сообщалось о популяционно-генетических исследованиях представителей семейства Куньи (Mustelidae). Всего было апробировано четыре группы STR-локусов: девять локусов, разработанных для норки американской (*Mustela vison*) [5, 6], шесть — для выдры речной (*Lutra lutra*) [7], восемь — для барсука обыкновенного (*Meles meles*) [8] и семь — для ласки обыкновенной (*Mustela nivalis*) [9]. Скрининг проводили по следующим основным критериям: температура отжига праймеров, тип tandemного повтора (предпочтение отдавали микросателлитам с простыми tandemными повторами), уровень аллельного разнообразия, гетерозиготность (H). Также учитывали диапазоны размеров аллелей микросателлитов для возможности их плексирования в одной ПЦР. Для оценки информативности при включении в тест-систему каждый из кандидатных локусов сначала проверяли на небольшой тестовой выборке образцов *M. vison* ($N = 5$) в монолокусной реакции, и при условии ее успешности далее оценивали их совместную амплифицируемость в мультилокусной ПЦР (мПЦР).

Оптимизация ПЦР и амплификация

Оптимизацию мПЦР проводили с использованием контрольных образцов, которые были протестированы в монолокусных ПЦР при отборе микросателлитных локусов. Прямые праймеры для всех локусов были модифицированы в 5'-положении флуоресцентными метками (6FAM, R6G, TMR или ROX, АО “ГенТерра”, РФ). Праймеры смешивали в различных пропорциях и амплифицировали при различных диапазонах температур отжига и количестве циклов ПЦР до достижения оптимальной интенсивности пиков и гетерозиготного баланса. Успешность мПЦР оценивали по конкордантности генотипов контрольных образцов, исследованных ранее в одноименных локусах в моноплексной ПЦР. После оптимизации тест-системы амплификацию проводили в следующих условиях: $1 \times$ ПЦР-буфер-Б, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs, 1 ед. акт. SynTaq-полимеразы (НПК “Синтол”, РФ), смесь праймеров (АО “ГенТерра”, РФ), 1 нг ДНК.

Мультилокусную ПЦР проводили на термоджеле C1000 (Bio-Rad, США) со следующими параметрами циклирования: 1 цикл ($95^\circ C$, 10 мин), 34 цикла ($95^\circ C$, 30 с $\rightarrow 61^\circ C$, 30 с $\rightarrow 72^\circ C$, 30 с), 1 цикл ($72^\circ C$, 30 мин $\rightarrow 4^\circ C$, $t = \infty$).

Капиллярный электрофорез

Амплифицированные продукты мПЦР детектировали методом капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе AB3500 (Thermo Fisher Scientific, США). Для разделения продуктов мПЦР использовали полимер POP-4 и капилляры 36 см (Thermo Fisher Scientific), время инъекции 15 с при 1.2 кВ для всех образцов. Размер фрагментов определяли относительно внутреннего размерного стандарта Orange500DNA Size Standard (NimaGen, Нидерланды). Генотипы образцов определяли с использованием программного обеспечения GeneMapper ID-X 1.4 (Thermo Fisher Scientific). Чтобы предотвратить ошибки генотипирования из-за возможного загрязнения и смещений бинов, в каждый анализ включали один положительный и один отрицательный контроль ПЦР.

Создание маркерной панели для идентификации аллелей

Маркерную панель для аллелей каждого локуса создавали с использованием опции Panel Manager специализированной программы GeneMapper ID-X v1.4 на основе результатов электрофоретического разделения продуктов ПЦР, полученных генотипированием тестовой группы образцов *M. vison*. На основе анализа пиков выявляемых аллелей для каждого маркера формировался набор “бинов”, который позволял бы идентифицировать все возможные варианты аллелей. Назначение “бинов” для идентификации аллелей проводилось в соответствии с их молекулярным размером, определенным относительно Orange500DNA Size Standard (NimaGen, Нидерланды).

Характеристика локусов и популяционные исследования

Всех исследованных американских норок ($N = 101$) изначально рассматривали как единую региональную популяционную выборку *Mustela vison* (MV_R). Для того, чтобы оценить уровень молекулярно-генетического разнообразия белорусской популяции норки американской, популяционные параметры рассчитывали суммарно для всех животных и отдельно для каждой из трех локальных выборок, сформированных с учетом 1) отнесения животных к дикой или фермерской популяции и 2) административной принадлежности фермерского хозяйства. Таким образом, одна локальная выборка включала 24 норки, добытые из дикой популяции (MV_W); вторая локальная выборка включала 27 фермерских животных из Минской области (MV_F1); третья локальная выборка включала 50 фермерских животных из Гродненской области (MV_F2).

Базовые статистические параметры популяционной генетики, включая количество аллелей на

локус, количество аллелей на выборку, наблюдаемую (H_o) и ожидаемую (H_e) гетерозиготность, коэффициент инбридинга (F), количество частных аллелей, частоты встречаемости аллелей маркеров для каждой выборки, соответствие наблюдаемого распределения генотипов для каждого отдельного локуса равновесию Харди–Вайнберга (HWE), рассчитывали с использованием программы GeneA1Ex 6.5 [10]. Неравновесие по сцеплению (LD) между парами локусов оценивали с помощью программного пакета Arlequin v3.5.1.3 [11]. Уровень генетической подразделенности популяции (F_{st}) вычисляли методом анализа молекулярной дисперсии (Analysis of Molecular Variance, AMOVA). Генетические взаимоотношения популяций дополнительно исследовали с использованием принципа главных компонент (Principal Component Analysis, PCoA) с использованием программы GeneA1Ex 6.5 [12]. Ожидаемые частоты нулевых аллелей рассчитывали с помощью программы Micro-Checker v2.2.3 [13]. Результаты множественных сравнений корректировали с использованием поправки Бонферрони [14].

Вероятности случайного совпадения профилей двух образцов (Random Match Probability, MP) рассчитывали с использованием правила умножения частот генотипов, рассчитанных двумя методами на основе рекомендаций 4.1 и 4.2 Национального исследовательского совета США (NRCII, US National Research Council) [4]. Расчет MP с учетом субструктуры популяции проводили в программном пакете MS Excel 2016 на основе эмпирически установленного значения F_{st} .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор микросателлитных локусов

Всего для разработки системы ДНК-анализа нами было исследовано 30 микросателлитных локусов на тестовой группе из 24 американских норок.

В ходе апробации девяти маркеров норки американской – *Mvi1321*, *Mvi1341*, *Mvi1354*, *Mvi1381*, *Mvi1271*, *Mvis002*, *Mvis022*, *Mvis072*, *Mvis075* установлено, что рекомендуемые в литературе для каждого из маркеров условия ПЦР обеспечивают достаточное для успешной регистрации количество нарабатываемого ПЦР-продукта и стабильную воспроизводимость результатов генотипирования. Все девять локусов были полиморфными и имели от четырех (*Mvis002*) до восьми (*Mvi1321*, *Mvi1341*, *Mvis075*) аллелей у животных, представляющих белорусскую популяцию норки американской. Выявляемые аллельные диапазоны исследованных локусов соответствовали описанным в литературе [5, 6].

Из шести протестированных локусов выдры речной три локуса – *Lut604*, *Lut457* и *Lut818* были полиморфными, при этом максимальное количе-

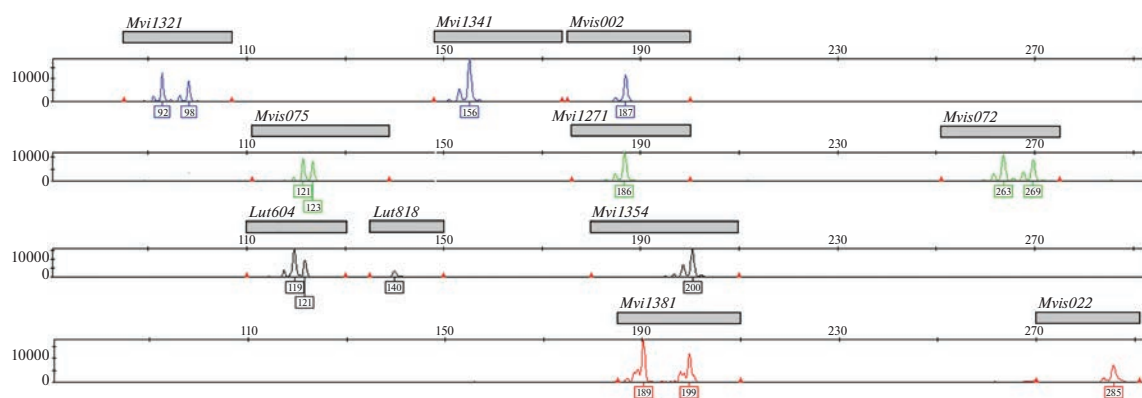


Рис. 1. Результаты исследования 11 микросателлитных локусов у норки американской на генетическом анализаторе AB3500.

ство аллелей было выявлено для локуса *Lut604* (семь аллелей). В трех локусах (*Lut833*, *Lut717* и *Lut615*) все животные исследованной выборки имели гомозиготные генотипы (123, 150, 217 пн соответственно). Выявленный в нашем исследовании характер проявления микросателлитных маркеров выдры речной при их переносе на норку американскую согласуется с данными исследования [7], авторы которого наблюдали существенно более низкий полиморфизм локусов *L. lutra* у четырех видов кунных — куницы лесной, норки американской, барсука и россомахи.

Уровень полиморфизма микросателлитных локусов барсука обыкновенного (*Meles meles*) *Mel16*, *Mel246*, *Mel15*, *Mel538*, *Mel09*, *Mel203*, *Mel522*, *Mel08* при переносе на норку американскую также был невысоким. Так, из восьми исследованных локусов в трех — *Mel15*, *Mel16* и *Mel538*, в тестовой выборке было обнаружено от трех до четырех аллелей; локусы *Mel09* и *Mel522* проявлялись как мономорфные (у всех норок амплифицировались одним фрагментом с размерами 161 и 196 пн соответственно); локусы *Mel246*, *Mel08* и *Mel203* не амплифицировались у целевого вида. Ни один из шести исследованных микросателлитных локусов ласки обыкновенной (*Mustela nivalis*) — *Mn6.9*, *Mn1.27*, *Mn3.6*, *Mn6.14*, *Mn1.6*, *Mn4.14* не амплифицировался специфически у норки американской: наблюдалось либо полное отсутствие ампликонов, либо большое количество неспецифических фрагментов.

По результатам проведенного скрининга в разработку криминалистической панели для генотипирования белорусской популяции норки американской из 30 кандидатных локусов включены следующие 15: *Mvi1321*, *Mvi1341*, *Mvi1354*, *Mvi1381*, *Mvi1271*, *Mvis002*, *Mvis022*, *Mvis072*, *Mvis075*, *Lut604*, *Lut457*, *Lut818*, *Mel15*, *Mel16* и *Mel538*, базовыми среди них были *Mvi*- и *Mvis*-локусы. В ходе предварительного тестирования 15 локусов в различных мультилокусных композициях четыре кан-

дидатных локуса *Lut457*, *Mel15*, *Mel16* и *Mel538* были исключены из панели по причине перекрытия аллельных диапазонов, несовместимости с базовыми локусами по условиям ПЦР и температурным параметрам амплификации или высокого гетерозиготного дисбаланса. Сформированная финальная тест-система включала 11 микросателлитных локусов (девять базовых *Mvi*- и *Mvis*-локусов, разработанных непосредственно для норки американской, и два дополнительных *Lut*-локуса, видом-источником которых является речная выдра). Характеристики входящих в тест-систему локусов приведены в табл. 1. Все 11 локусов соответствовали установленным критериям качества, успешно амплифицировались в составе одной мультиплексной ПЦР, характеризовались относительно высокой гетерозиготностью и большим количеством аллелей в исследованной выборке. При использовании четырех различных флуоресцентных красителей 6FAM, R6G, TMR и ROX для мечения праймеров и Nima-Gen для размерного стандарта продукты амплификации всех локусов детектировались в четырех спектральных каналах генетического анализатора без перекрытия аллельных диапазонов (рис. 1).

Генетический полиморфизм 11 микросателлитных локусов

Параметры генетического разнообразия 11 микросателлитных локусов, такие как количество аллелей на локус (N_a), количество эффективных аллелей на локус (N_e), наблюдаемая (H_o) и ожидаемая (H_e) гетерозиготность, коэффициент инбридинга (F), рассчитанные в среднем на всю региональную популяционную выборку *M. vison* ($N = 101$), представлены в табл. 1.

Суммарно у исследованных американских норок в 11 локусах было идентифицировано 80 аллелей. Количество аллелей варьировало от трех до 11 и в среднем по всем локусам составило 6.24. Локальные выборки практически не различались между

Таблица 1. Характеристика 11 микросателлитных локусов в белорусской популяции норки американской ($N = 101$)

Локус	Номер в GenBank	Тандемный повтор	Флуоресцентная метка	Размерный диапазон	N_a	N_e	H_o	H_e	F	P_{HWE}	NAF
<i>Mvi1321</i>	AF480847	(CA)n	6FAM	88–106	10	4.56	0.743	0.787	0.01	0.6519	0.00
<i>Mvi1341</i>	AF480850	(CA)n	6FAM	150–170	10	4.04	0.653	0.778	0.15	0.0196	0.07
<i>Mvis002</i>	AF132100	(CA)n	6FAM	175–189	6	1.58	0.297	0.315	–0.01	0.7093	0.00
<i>Mvis075</i>	AF132105	(CA)n	R6G	116–133	9	4.66	0.792	0.832	–0.02	0.4973	0.00
<i>Mvi1271</i>	AF480844	(CA)n	R6G	182–192	6	3.96	0.683	0.768	0.08	0.0916	0.00
<i>Mvis072</i>	AF132104	(CA)n	R6G	257–271	7	2.99	0.604	0.677	0.03	0.0015	0.00
<i>Lut604</i>	Y16300	*(CA)n	TAMRA	111–127	7	3.48	0.644	0.739	0.11	0.0419	0.05
<i>Lut818</i>	Y16295	*(GATA)n	TAMRA	140–146	3	2.66	0.495	0.652	0.16	0.0036	0.11
<i>Mvi1354</i>	AF480852	(CA)n	TAMRA	184–202	10	3.10	0.584	0.672	0.10	0.0391	0.05
<i>Mvi1381</i>	AF421188	(AC)n	ROX	189–201	7	3.33	0.733	0.743	–0.05	0.4205	0.00
<i>Mvis022</i>	AF132102	(CA)n	ROX	189–289	5	2.89	0.554	0.657	0.12	0.0517	0.06
				Среднее (S.D.)	7.272 (0.689)	3.386 (0.270)	0.617 (0.041)	0.693 (0.042)	0.062 (0.022)		0.03 (0.01)

Примечание. N_a – количество аллелей на локус; N_e – количество эффективных аллелей на локус; H_o – наблюдаемая гетерозиготность; H_e – ожидаемая гетерозиготность; F – коэффициент инбридинга; P_{HWE} – уровень значимости отклонения от равновесия Харди–Вайнберга ($\alpha = 0.0045$); NAF – ожидаемая частота нулевых аллелей; * повтор у вида-источника – выдры речной (*L. lutra*).

собой по среднему числу аллелей на локус (N_a) и суммарному количеству выявленных аллелей, а наблюдаемые незначительные различия, вероятно, являлись результатом несовпадения численности животных в каждой из группировок (табл. 2). В локальной выборке MV_F2 с максимальной численностью ($N = 50$) идентифицирован 71 аллель, в двух других — MV_W ($N = 24$) и MV_F1 ($N = 27$) выявлено 67 и 68 аллелей соответственно.

В общей региональной выборке самое низкое и самое высокое количество эффективных аллелей (N_e) имели локусы *Mvis002* и *Mvis075* — 1.58 и 4.66 соответственно. Во всех трех группах эффективное число аллелей было в 1.5–2 раза ниже, чем наблюдаемое, при этом самое низкое среднее значение N_e (2.85) зарегистрировано в локальной выборке MV_F1 (фермерские животные), а самые высокие средние показатели генетической изменчивости отмечены в локальной выборке MV_W, представляющей дику популяцию американской норки в Беларуси ($N_e = 3.86$). Для диких животных также характерны наиболее высокие средние значения наблюдаемой (H_o) и ожидаемой (H_e) гетерозиготности по исследованным 11 микросателлитным локусам, при том что эти показатели во всех выборках были выше 50%. В среднем H_o составила 0.622 и варьировала от 0.552 в популяции MV_F1 до 0.705 в дикой выборке MV_W, H_e изменялась от 0.607 (MV_F1) до 0.711 (MV_W). Таким образом, все рассчитанные генетические параметры демонстрируют, что выборка диких норок характеризуется большим генетическим разнообразием по сравнению с двумя локальными группами фермерских норок.

Значения коэффициента инбридинга (F) на уровне вида варьировали от -0.05 у локуса *Mvi1381* до 0.16 у локуса *Lut818* и составили в объединенной выборке 0.062 (табл. 2). Положительное среднее значение F указывает на недостаток гетерозигот в каждой из групп американской норки. Основным вклад в редукцию средней гетерозиготности вносят фермерские животные — дефицит гетерозигот в выборках MV_F1 и MV_F2 составил 9.7 и 8.1% соответственно, что на порядок выше, чем в дикой выборке MV_W (0.08%). Высокий положительный уровень инбридинга у норок из фермерских хозяйств может быть связан с эффектом генетического дрейфа, который обусловлен недостаточным числом производителей, используемых в процессе разведения и/или родственным спариванием.

Всего у исследованных американских норок выявлено 20 приватных аллелей, 13 из которых присутствовали только у фермерских животных (“домашние аллели”) и семь — только у диких (“дикие аллели”). Максимальное число приватных аллелей детектировано в локусе *Mvi1354* — 5.

Распределение приватных аллелей внутри двух локальных выборок фермерских животных раз-

личалось незначительно. В выборке MV_F1 из 13 “домашних аллелей” идентифицировано девять, в выборке MV_F2 — 12. Восемь аллелей являются общими для обеих фермерских выборок (*Mvi1321*-88, *Mvi1321*-106, *Mvi1341*-162, *Mvi1341*-168, *Mvis075*-133, *Mvis072*-265, *Mvi1354*-196, *Mvi1354*-198). Четыре аллеля *Mvis002*-175, *Mvis002*-189, *Mvi1354*-186, *Mvi1381*-191 обнаружены только в MV_F2, один *Mvi1381*-195 — только в MV_F1.

Информация о частотах встречаемости приватных аллелей в исследованных выборках суммирована в табл. 3. Из 20 приватных аллелей восемь (40%) имеют частоту встречаемости выше 0.05. Наиболее информативными маркерными аллелями для животных из зверохозяйств являются два — *Mvi1341*-162 (средняя частота в домашней выборке 0.149) и *Mvis072*-265 с частотой 0.162, которые в совокупности встречаются у 30% домашних норок. Хорошим маркерным аллелем “дикий” группы является *Mvi1354*-194, характерный для 27% американских норок из природной популяции. Приватные аллели с высокой частотой встречаемости могут быть использованы в дальнейшем для идентификации биологических образцов по их принадлежности дикому или домашнему животному. Высокая пропорция приватных аллелей (10.4% от их общего числа у диких норок и 17.8% — у домашних) указывает на то, что дикие и фермерские американские норки в Беларуси имеют специфичные генофонды.

Распределение аллелей и генотипов в популяционных выборках

В объединенной выборке американской норки в пяти локусах — *Mvi1341*, *Lut604*, *Lut818*, *Mvi1354*, *Mvis022* отмечено достоверное отклонение ($P < 0.05$) распределения частот генотипов от равновесия Харди–Вайнберга (HWE). При введении поправки Бонферрони на множественность сравнений (для набора из 11 тестов фактический уровень значимости равен 0.0045) статистически достоверное отклонение от HWE сохраняется для двух локусов — *Mvis072* и *Lut818* (данные представлены в табл. 1). Две локальные популяции — дикая и одна фермерская MV_F1 находятся в равновесии по всем локусам. Для второй фермерской популяции MV_F2 зарегистрировано отклонение от HWE в четырех локусах (*Mvis072*, *Lut604*, *Lut818*, *Mvi1381*). После введения поправки Бонферрони для этой фермерской популяции достоверное отклонение от HWE сохранилось для двух локусов — *Mvis072* и *Lut818*. Одной из наиболее вероятных причин отклонения двух локусов от HWE в популяционной выборке MV_F2 является высокая ожидаемая частота нулевых аллелей. Так, для локуса *Mvis072* зарегистрирован недостаток гетерозигот всех типов (гетерозиготы, включающие все зарегистрированные для выборки аллельные

Таблица 2. Генетическое разнообразие трех локальных выборок норки американской (*M. vison*) в Беларуси

Популяция	Локус	N_a	N_e	H_o	H_e	F	P_{HWE}	NAF
MV_W (дикая) $N = 24$	<i>Mvi1321</i>	8	6.857	0.917	0.854	−0.073	0.6123	0.00
	<i>Mvi1341</i>	8	4.608	0.625	0.783	0.202	0.0154	0.08
	<i>Mvis002</i>	4	2.129	0.542	0.530	−0.021	0.1903	0.00
	<i>Mvis075</i>	8	4.000	0.792	0.750	−0.056	0.6052	0.00
	<i>Mvi1271</i>	6	4.085	0.750	0.755	0.007	0.6141	0.00
	<i>Mvis072</i>	6	3.388	0.875	0.705	−0.241	0.6946	0.00
	<i>Lut604</i>	7	3.182	0.625	0.686	0.089	0.3260	0.00
	<i>Lut818</i>	3	2.083	0.500	0.520	0.038	1.0000	0.00
	<i>Mvi1354</i>	7	4.721	0.667	0.788	0.154	0.3673	0.00
	<i>Mvi1381</i>	5	3.470	0.750	0.712	−0.054	0.5230	0.00
	<i>Mvis022</i>	5	3.866	0.708	0.741	0.044	0.0856	0.00
	Среднее (S.D.)	6.091 (0.513)	3.855 (0.397)	0.705 (0.039)	0.711 (0.031)	0.008 (0.036)		
MV_F1 (фермерская F1) $N = 27$	<i>Mvi1321</i>	8	2.751	0.593	0.636	0.069	0.1370	0.00
	<i>Mvi1341</i>	8	3.383	0.593	0.704	0.159	0.1387	0.00
	<i>Mvis002</i>	3	1.395	0.259	0.283	0.085	0.5443	0.00
	<i>Mvis075</i>	9	4.658	0.815	0.785	−0.038	0.4505	0.00
	<i>Mvi1271</i>	6	3.673	0.630	0.728	0.135	0.0369	0.00
	<i>Mvis072</i>	6	2.514	0.556	0.602	0.077	0.4706	0.00
	<i>Lut604</i>	7	3.306	0.593	0.698	0.150	0.1416	0.00
	<i>Lut818</i>	3	2.922	0.593	0.658	0.099	0.5125	0.00
	<i>Mvi1354</i>	7	1.701	0.333	0.412	0.191	0.0205	0.00
	<i>Mvi1381</i>	6	3.122	0.704	0.680	−0.035	0.9861	0.00
	<i>Mvis022</i>	5	1.976	0.407	0.494	0.175	0.1192	0.00
	Среднее (S.D.)	6.182 (0.585)	2.855 (0.283)	0.552 (0.049)	0.607 (0.046)	0.097 (0.023)		
MV_F2 (фермерская F2) $N = 50$	<i>Mvi1321</i>	9	4.082	0.740	0.755	0.020	0.5209	0.00
	<i>Mvi1341</i>	8	4.125	0.700	0.758	0.076	0.1380	0.00
	<i>Mvis002</i>	4	1.226	0.200	0.185	−0.083	1.0000	0.00
	<i>Mvis075</i>	9	5.325	0.780	0.812	0.040	0.4294	0.00
	<i>Mvi1271</i>	6	4.125	0.680	0.758	0.102	0.3295	0.00
	<i>Mvis072</i>	6	3.081	0.500	0.675	0.260	0.0006	0.01
	<i>Lut604</i>	7	3.943	0.680	0.746	0.089	0.0361	0.00
	<i>Lut818</i>	3	2.985	0.440	0.665	0.338	0.0014	0.17
	<i>Mvi1354</i>	8	2.887	0.680	0.654	−0.040	0.3175	0.00
	<i>Mvi1381</i>	6	3.394	0.740	0.705	−0.049	0.0386	0.00
	<i>Mvis022</i>	5	2.828	0.560	0.646	0.134	0.1113	0.00
	Среднее (S.D.)	6.455 (0.593)	3.455 (0.317)	0.609 (0.052)	0.669 (0.051)	0.081 (0.039)		

Таблица 3. Частоты встречаемости приватных аллелей в исследованных выборках норки американской (*M. vison*)

Локус	Аллели	Дикие животные <i>N</i> = 24	Все фермерские животные <i>N</i> = 77	Фермерские (F1) <i>N</i> = 27	Фермерские (F2) <i>N</i> = 50
<i>Mvi1321</i>	88		0.0195	0.0185	0.0400
	104	0.0208			
	106		0.0325	0.0370	0.0100
<i>Mvi1341</i>	150	0.0625			
	160	0.0208			
	162		0.1494	0.2037	0.1200
	168		0.0844	0.0926	0.0800
<i>Mvi002</i>	175		0.0130		0.0200
	185	0.0417			
	189		0.0065		0.0100
<i>Mvi075</i>	133		0.0130	0.0185	0.0100
<i>Mvi072</i>	261	0.0625			
	265		0.1623	0.1296	0.1800
<i>Mvi1354</i>	186		0.0065		0.0100
	188	0.0625			
	194	0.2708			
	196		0.0390	0.0370	0.0400
	198		0.0584	0.0185	0.0800
<i>Mvi1381</i>	191		0.0065		0.0100
	195		0.0065	0.0185	
Число приватных аллелей	20	7	13	9*	12*
% от общего числа аллелей	25.0	10.4	17.8	13.2	16.9

Примечание. * По отношению к выборке диких животных; жирным шрифтом выделены приватные аллели с частотой $\geq 5\%$.

варианты), при этом ожидаемая доля нулевых аллелей в локусе может достигать 11%. Для локуса *Lut818* количество предполагаемых нулевых аллелей достигает 17%, также для этого локуса отмечен недостаток гетерозигот, аллельные варианты которых различаются на один тандем, что может свидетельствовать о наличии ошибок генотипирования, связанных со статтер-эффектом. При пересчете на общую региональную выборку ожидаемая популяционная частота нулевых аллелей для всех локусов $< 12\%$, что согласно исследованиям А.С. Kelly et al. [15] является приемлемым уровнем, который существенно не влияет на популяционные частоты аллелей, но может приводить к ложному исключению родства. Таким образом, экспертам рекомендуется с осторожностью интерпретировать гомозиготные генотипы в локусах *Mvis072* и *Lut818*, особенно при генотипировании образцов ДНК плохого качества, являющихся дополнительным источником ошибок. Рассчитанные для общей выборки ожидаемые частоты

нулевых аллелей (*NAF*, Null Allele Frequency) для каждого локуса приведены в табл. 1.

Анализ неравновесия по сцеплению (*LD*) для 11 локусов в совокупной региональной выборке *Mustela* показал вероятное наличие 23 пар сцепленных локусов. Чтобы проверить это предположение, анализ на сцепленность был выполнен отдельно для каждой из локальных групп, как было описано в работе [16] при разработке микросателитной панели для белохвостых оленей. При оценке *LD* на локальном уровне количество вероятных групп сцепления существенно снижалось — до пяти в дикой популяции (*MV_W*), трех в фермерской *MV_F1* и 14 в фермерской *MV_F2*, при этом ни один из блоков сцепленных локусов не был общим для всех трех популяций. Это наблюдение позволяет предположить, что вероятнее всего в геноме норки американской все 11 локусов наследуются независимо. Для достоверного исключения неравновесного сцепления локусов требуются дополнительные исследования семейных групп,

однако получить такие данные очень сложно, особенно для диких животных.

Генетическая дифференциация исследованных выборок

Поскольку наблюдаемое достоверное отклонение от HWE в объединенной выборке американской норки может быть обусловлено ее подразделенностью, был проведен анализ генетических различий между локальными группировками методом молекулярной дисперсии (AMOVA). Согласно полученным данным 4.4% генетического разнообразия в совокупной выборке норки американской обеспечиваются различиями между локальными популяциями ($F_{st} = 0.04397$, $P < 0.005$). При объединении норк двух ферм в одну группу индекс F_{st} , характеризующий различия между группами дикой и домашней норки, достоверно увеличивался до 0.05617 ($P < 0.005$), при этом на различия между двумя популяциями фермерских животных приходилось около 1% всего генетического разнообразия ($F_{st} = 0.01109$, $P < 0.005$), что свидетельствует о том, что дикие и домашние норки различаются между собой в большей степени, чем две локальные популяции животных, выращенных в неволе. Эти наблюдения подтверждаются данными парных сравнений F_{st} для трех локальных выборок (табл. 4), а также данными визуализации генетических расстояний методом анализа главных компонент PCoA (рис. 2). Кластеризация выборок норки американской по 11 микросателлитным локусам показывает, что в массиве генотипов выделяются генотипы диких норк, образующие достаточно компактную группу в нижней части диаграммы,

Таблица 4. Значения попарных F_{st} для трех локальных выборок американской норки из Беларуси

Выборки	MV_W	MV_F1	MV_F2
MV_W	—	*	*
MV_F1	0.0742	—	*
MV_F2	0.0627	0.0130	—

* $P < 0.05$.

ограниченно перекрывающуюся с единым облаком генотипов двух фермерских популяций, занимающих верхнюю часть поля диаграммы.

Анализ различий в распределении генетических признаков между исследованными популяционными выборками норки американской позволил выявить статистически достоверную разницу между частотами аллельных вариантов дикой и домашней групп в восьми из 11 локусов — *Mvi1341*, *Mvis002*, *Mvis075*, *Lut604*, *Lut818*, *Mvi1354*, *Mvi1381*, *Mvis022* ($P < 0.0045$ с учетом поправки Бонферрони), при этом распределение аллелей в двух популяциях фермерских норк (MV_F1 и MV_F2) достоверно не различалось.

Таким образом, с использованием различных статистических подходов по результатам изучения полиморфизма 11 микросателлитных локусов установлена невысокая, но достоверная генетическая дифференциация между дикими и фермерскими норками, что с учетом наличия частных аллелей указывает на неоднородность генетической структуры белорусской популяции *M. vison*, обусловленную существованием этого вида в “дикой” и “домашней” формах.

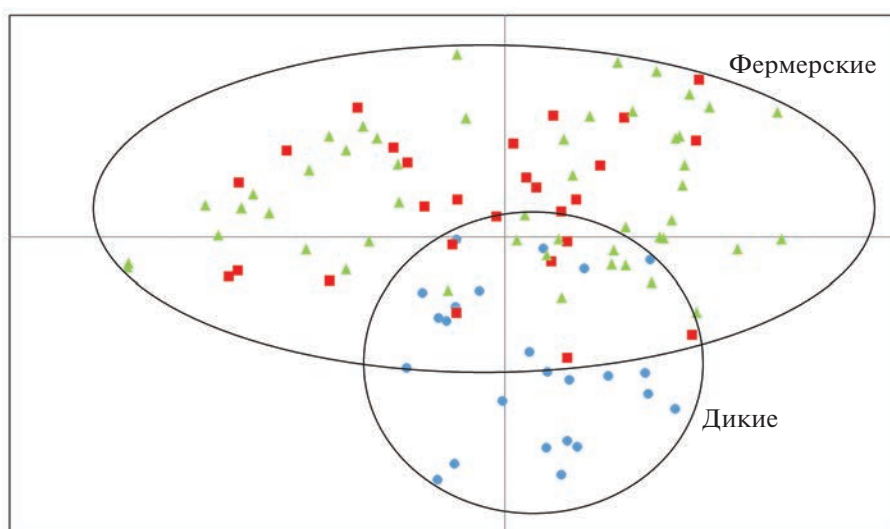


Рис. 2. Данные визуализации генетических расстояний между дикими и фермерскими норками, полученные методом анализа главных компонент PCoA. Голубые круги — дикие норки; красные квадраты и зеленые треугольники — две фермерские группы.

Таблица 5. Средние значения вероятности случайного совпадения (MP) генотипов двух неродственных особей норки американской

Локус	MP	$MP_{\text{дик.}}$	$MP_{\text{дом.}}$	$MP_F (F_{st} = 0.044)$
<i>Mvi1321</i>	0.0711	0.0729	0.1007	0.1402
<i>Mvi1341</i>	0.0856	0.1146	0.1017	0.1458
<i>Mvis002</i>	0.5067	0.3229	0.6168	0.5834
<i>Mvis075</i>	0.0548	0.1076	0.0632	0.1109
<i>Mvi1271</i>	0.0952	0.1146	0.1020	0.1546
<i>Mvis072</i>	0.1413	0.1528	0.1766	0.2229
<i>Lut604</i>	0.1120	0.1563	0.1233	0.1706
<i>Lut818</i>	0.1818	0.3056	0.1763	0.2541
<i>Mvi1354</i>	0.1669	0.0868	0.2262	0.2272
<i>Mvi1381</i>	0.1091	0.1493	0.1334	0.1755
<i>Mvis022</i>	0.1656	0.1458	0.2157	0.2337
СМР	1.39×10^{-10}	4.59×10^{-10}	1.02×10^{-9}	1.84×10^{-8}
1 из...	7164613059	2179968313	982841075	54318664

Примечание. СМР — совокупности по всем локусам.

Следует отметить, что похожие результаты были получены при изучении американских норок, обитающих в других регионах. Так, A. Michalska-Parda et al. [17] установили, что в Польше дикие и домашние норки принадлежат к двум генетически близким, но отдельным группам (88% норок, отобранных из дикой популяции, были отнесены к дикой группе, тогда как остальные 12% — к норкам, разводимым в фермерских хозяйствах). В работе K.Y. Morris et al. [18] были обнаружены существенные различия между дикими и фермерскими американскими норками в Канаде, в частности содержащиеся в неволе животные по сравнению с дикими имели другие частоты и меньшее количество аллелей как в нейтральных, так и в функциональных локусах.

В разрезе криминалистического ДНК-анализа выявленная генетическая дифференциация популяции *M. vison* требует формирования отдельных баз частот аллелей для диких и фермерских животных. В случае, когда принадлежность животного к одной из групп известна, для расчета вероятности случайного совпадения генотипов (MP) должна использоваться соответствующая референтная база. Когда же происхождение животного неизвестно, корректно применять консервативную процедуру расчета MP с использованием поправки на генетическую дифференциацию популяций, руководствуясь рекомендациями Национального исследовательского совета США (NRCII) [4]. Средние значения вероятности случайного совпадения генотипов двух неродственных особей американской норки были рассчитаны нами каждым из двух подходов и для сравнения представлены в табл. 5. Как видно, средние значения

MP , рассчитанные для всех 11 локусов сформированной тест-системы с учетом и без учета коэффициента F_{st} , различаются на два порядка (1.84×10^{-8} и 1.39×10^{-10} соответственно). Таким образом, не используя корректирующее F_{st} при оценке вероятности случайного совпадения генотипов в подразделенной популяции мы будем недооценивать MP , получая кажущуюся более низкую вероятность случайного совпадения двух профилей. Средние значения MP , рассчитанные на основе генотипов диких и домашних животных, отличаются более чем на один порядок, также наглядно демонстрируя, что использование неадекватной референтной базы данных при идентификационных исследованиях может привести к снижению дискриминирующей способности метода.

С учетом представленных выше фактических данных для корректного использования идентифицирующей тест-системы из 11 микросателлитных локусов в экспертной практике в Республике Беларусь частоты встречаемости аллелей данных локусов были рассчитаны для общей региональной популяции американской норки и для каждой из групп (“дикой” и “фермерской”) (табл. 6). Для учета популяционной стратификации при невозможности отнесения исследуемых образцов к одной из групп частоты генотипов могут быть рассчитаны с поправкой на эмпирически установленный коэффициент $F_{st} = 0.044$, что, как было показано, позволит учитывать максимально возможные различия между двумя группами американских норк.

Необходимость формирования надежных референтных баз данных для видов животных, по-

Таблица 6. Частоты встречаемости аллелей 11 микросателлитных локусов в дикой (MV_W, N = 24), фермерской (MV_F, N = 77) и в общей региональной (MV_R, N = 101) популяции норки американской (*M. vison*)

Локус	Популяция			Локус	Популяция			Локус	Популяция			Локус	Популяция		
	MV_W	MV_F	MV_R		MV_W	MV_F	MV_R		MV_W	MV_F	MV_R		MV_W	MV_F	MV_R
Mvis075				Mvi1271				Lut818				Mvi1321			
117	0.1250	0.0260	0.0495	182	0.0417	0.0520	0.0495	140	0.6042	0.3636	0.4208	88	—	0.0325	0.0248
119	0.0625	0.0649	0.0643	184	0.3541	0.2078	0.2426	142	0.3333	0.3507	0.3465	90	0.2083	0.0260	0.0693
121	0.2083	0.2792	0.2624	186	0.2291	0.3571	0.3267	146	0.0625	0.2857	0.2327	92	0.1250	0.1234	0.1238
123	0.4167	0.0909	0.1683	188	0.2292	0.2078	0.2129	Mvi1354	MV_W	MV_F	MV_R	94	0.1459	0.4805	0.4010
125	0.0417	0.0520	0.0495	190	0.1042	0.1623	0.1485	184	0.0833	0.0195	0.0346	96	0.1459	0.0649	0.0842
127	0.0208	0.1039	0.0842	192	0.0417	0.0130	0.0198	186	—	0.0065	0.0050	98	0.1250	0.1169	0.1188
129	0.1042	0.2662	0.2277	Mvis072	MV_W	MV_F	MV_R	188	0.0625	—	0.0149	100	0.0833	0.0389	0.0495
131	0.0208	0.1039	0.0842	257	0.0625	0.0195	0.0297	190	0.0833	0.0584	0.0644	102	0.1458	0.0974	0.1089
133	—	0.0130	0.0099	261	0.0625	—	0.0148	192	0.1458	0.1883	0.1782	104	0.0208	—	0.0049
Mvis022				263	0.4792	0.5130	0.5049	194	0.2709	—	0.0643	106	—	0.0195	0.0148
281	0.1667	0.0260	0.0594	265	—	0.1623	0.1238	196	—	0.0390	0.0297	Mvi1341	MV_W	MV_F	MV_R
283	0.1042	0.1169	0.1139	267	0.0833	0.0389	0.0495	198	—	0.0584	0.0445	150	0.0625	—	0.0149
285	0.3958	0.5714	0.5297	269	0.1875	0.2338	0.2228	200	0.3125	0.6039	0.5347	154	0.2084	0.0974	0.1238
287	0.2292	0.0584	0.0990	271	0.1250	0.0325	0.0545	202	0.0417	0.0260	0.0297	156	0.3125	0.4481	0.4158
289	0.1042	0.2273	0.1980	Lut604	MV_W	MV_F	MV_R	Mvi1381	MV_W	MV_F	MV_R	158	0.2500	0.0649	0.1089
Mvis002				111	0.1875	0.0455	0.0792	189	0.0625	0.4026	0.3218	160	0.0208	—	0.0050
175	—	0.013	0.0099	115	0.1042	0.0389	0.0544	191	—	0.0065	0.0049	162	—	0.1493	0.1138
177	0.0625	0.0065	0.0198	117	0.0417	0.1039	0.0891	193	0.3958	0.3312	0.3465	164	0.0417	0.0325	0.0347
183	0.2708	0.0974	0.1386	119	0.5000	0.4350	0.4505	195	—	0.0065	0.0050	166	0.0833	0.0390	0.0495
185	0.0417	—	0.0099	121	0.1250	0.1234	0.1238	197	0.0417	0.0844	0.0743	168	—	0.0844	0.0643
187	0.625	0.8766	0.8168	123	0.0208	0.2143	0.1683	199	0.2708	0.0584	0.1089	170	0.0208	0.0844	0.0693
189	—	0.0065	0.0050	127	0.0208	0.0390	0.0347	201	0.2292	0.1104	0.1386				

падающих в сферу судебно-экспертных исследований, и выбора адекватных методов статистических расчетов, которые целесообразно использовать для оценки MP , широко обсуждается в работах зарубежных авторов. Например, были разработаны тест-системы и обоснованы подходы к расчету MP с использованием референтных баз для косуль в Шотландии [19], подвидов североамериканских белохвостых и чернохвостых оленей в Канаде [20, 21], популяций благородных оленей в Венгрии [22]. Ранее нами также были разработаны репрезентативные базы данных частот аллелей STR-локусов, учитывающие генетическую дифференциацию диких кабанов и домашних свиней [23] и региональную структуру популяций диких парнокопытных — лосей и косуль Беларуси [24]. В настоящей работе на примере норки американской (*M. vison*) продемонстрировано влияние структуры популяции на вероятность случайного совпадения профилей ДНК и обоснована значимость включения F_{st} в расчет MP .

*Идентификационный
потенциал 11 микросателлитных локусов
в белорусской популяции норки американской*

Рассчитанная на основе частот встречаемости аллелей 11 STR-локусов в “дикой” популяции средняя вероятность того, что две выбранные случайным образом особи норки американской будут иметь одинаковый мультилокусный генотип, равна 4.59×10^{-10} (т.е. случайное совпадение генотипа возможно с одной из 2×10^9 норок). С учетом численности дикой популяции *M. vison* в Республике Беларусь, составляющей по состоянию на 2021 г. 24475 особей [2], идентифицирующая способность 11 STR-локусов разработанной тест-системы более чем достаточна для применения в экспертном ДНК-анализе.

По результатам апробации 30 микросателлитных локусов, разработанных для представителей семейства Куньи, сформирована 11-локусная панель, которая обладает достаточным уровнем полиморфизма и высокой разрешающей способностью при проведении идентификационных исследований биологических образцов животных вида норка американская (*M. vison*) Республики Беларусь. Суммарно в исследованных выборках из белорусской популяции американских норок для 11 локусов идентифицировано 80 аллелей, при этом в среднем на locus приходится 6.24 аллеля, а наблюдаемая гетерозиготность варьирует от 30 до 80%. Исследованная выборка из дикой популяции американской норки генетически более разнообразна по сравнению с фермерскими животными. Установленные параметры генетического разнообразия девяти базовых *Mvi*- и *Mvis*-локусов разработанной тест-системы существенно не отличаются от значений, полученных на популяциях американских норок из Канады [6] и США [5].

Показано, что, несмотря на генетическую близость диких и фермерских норок, формирующих популяцию животных вида *M. vison* в Беларуси, для каждой из этих двух исследованных групп характерна специфичная популяционно-генетическая структура. Применительно к криминалистическому ДНК-анализу это требует при расчете MP использовать либо частоты аллелей, специфичные для соответствующей группы (дикой или фермерской), либо частоты для всей популяции с корректировкой на эмпирически установленное значение F_{st} . На значимость учета происхождения биологических образцов от одной из групп при оценке MP указывают выявленные различия в распределении аллельных частот в исследованных выборках диких и фермерских норок. Все рассчитанные значения MP в дикой и домашней популяциях норки американской на несколько порядков превышают установленный в настоящее время уровень дискриминационного потенциала (выше, чем один из 1 млн), обеспечивая убедительную поддержку в суде гипотезы о неслучайном совпадении сравниваемых генотипов [25].

Проведенное исследование ориентировано в первую очередь на судебно-экспертный анализ биологических образцов животных вида норка американская; сформированная панель идентифицирующих ДНК-маркеров может быть использована для изучения генетического разнообразия и мониторинга диких популяций *Mustela vison*, а также для генетической паспортизации фермерских животных, установления достоверности происхождения потомства и оценки эффективности ведения селекционной работы в фермерских хозяйствах.

Данная работа тематически продолжает и развивает проводимые в Республике Беларусь исследования в области судебного ДНК-анализа объектов животного происхождения, способствуя стандартизации подходов к статистическому анализу данных и приведению их в соответствие с международной практикой [26].

Целью дальнейших исследований является поиск наиболее информативных микросателлитных маркеров для создания тест-систем, адаптированных к работе с “криминалистическими” образцами, и подбор ДНК-маркеров для видовой идентификации и установления половой принадлежности *Mustela vison*.

Авторы выражают благодарность всем охотоведам и охотникам за сбор образцов, а также персонально В.В. Козловскому (заместителю начальника управления охоты, рыболовства и туризма республиканского государственного общественного объединения “Белорусское общество охотников и рыболовов”), И.С. Юрченко (заведующему отделом экологии фауны государственного природоохранного научно-исследовательского учреждения “Полесский государственный радиационно-

экологический заповедник”) и Г.В. Попову (директору республиканской ассоциации по звероводству и переработке пушно-мехового сырья “Бел-пушнина”) за помощь в формировании коллекций биологических образцов.

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сидорович В.Е., Ставровский Д.Д. Норка американская // Звери: популярный энциклопедический справочник (животный мир Беларуси). Минск, 2003. С. 217–222.
2. Министерство лесного хозяйства Республики Беларусь. Отчет о ведении охотничьего хозяйства за 2021 год. Минск, 2022. 6 с.
3. Valnisty A.A., Homel K.V., Kheidorova E.E. et al. Molecular genetic polymorphism of American mink populations (*Neovison vison*) in model fur farms and on the adjacent territories in Belarus // Dokl. Natl Acad. Sci. Belarus. 2020. V. 64. № 6. P. 685–693. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2020-64-6-685-693>
4. The Evaluation of Forensic DNA Evidence. Committee on DNA Forensic Science: an update. Washington (D.C.): Natl Acad. Press, 1996. 272 p. <https://doi.org/10.17226/5141>
5. Fleming M.A., Ostrander E.A., Cook J.A. Microsatellite markers for American mink (*Mustela vison*) and ermine (*Mustela erminea*) // Mol. Ecol. 1999. V. 8. P. 1351–1362. https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1999.00701_2.x
6. Vincent I.R., Farid A., Otieno C.J. Variability of thirteen microsatellite markers in American mink // Can. J. Anim. Sci. 2003. V. 83. P. 597–599. <https://doi.org/10.4141/A03-001>
7. Dallas J.F., Pierny S.B. Microsatellite primers for the Eurasian otter // Mol. Ecol. 1998. V. 7. P. 1248–1250.
8. Annavi G., Dawson D.A., Horsburgh G.J. et al. Characterization of twenty-one European badger (*Meles meles*) microsatellite loci facilitates the discrimination of second-order relatives // Conservation Genet. Resour. 2011. V. 3. P. 515–518. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9392-9>
9. Rodrigues M., Santos-Reis M., Elmeros M. et al. Markers for genetic studies in the weasel (*Mustela nivalis*) // Eur. J. Wildl. Res. 2012. V. 58. P. 507–510. <https://doi.org/10.1007/s10344-011-0583-1>
10. GeneAId 6.5: Genetic Analysis in Excel [Электронный ресурс]. URL: <https://biology-assets.anu.edu.au/GeneAId/Welcomes.html> (дата обращения 20.04.2022).
11. Arlequin: An Integrated Software for Population Genetics Data Analysis [Электронный ресурс]. URL: <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3> (дата обращения 02.05.2022).
12. Peakall R., Smouse P.E. GENEALEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Mol. Ecol. 2006. V. 6. P. 288–295. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
13. Hutchinson W.F.D., Wills D., Shipley P. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data // Mol. Ecol. Notes. 2004. V. 4. № 3. P. 535–538. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>
14. Rice W.R. Analyzing tables of statistical tests // Evolution. 1989. V. 43. P. 223–225. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1989.tb04220.x>
15. Kelly A.C., Mateus-Pinilla N.E., Douglas M. et al. Microsatellites behaving badly: empirical evaluation of genotyping errors and subsequent impacts on population studies // Genet. Mol. Research. 2011. V. 10. № 4. P. 2534–2553. <https://doi.org/10.4238/2011.October.19.1>
16. Miller W.L., Edson J., Pietranrea P. et al. Identification and evaluation of core microsatellite panel for use in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) // BMC Genetics. 2019. V. 20. № 49. P. 1–14.
17. Michalska-Parda A., Brzeziński M., Zalewski A. et al. Genetic variability of feral and ranch American mink *Neovison vison* in Poland // Acta Theriologica. 2009. V. 54. P. 1–10. <https://doi.org/10.1007/BF03193132>
18. Morris K.Y., Bowman J., Schulte-Hostedde A. et al. Functional genetic diversity of domestic and wild American mink (*Neovison vison*) // Evol. Appl. 2020. V. 13. P. 2610–2629. <https://doi.org/10.1111/eva.13061>
19. Morf N.V., Kopps A.M., Nater A. et al. STRoe deer: A validated forensic STR profiling system for the European roe deer (*Capreolus capreolus*) // Forensic Sci. Intern.: Animals and Environments. 2021. V. 1. P. 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fsiae.2021.100023>
20. Jobin R.M., Patterson D., Zhang Y. DNA typing in populations of mule deer for forensic use in the Province of Alberta // Forensic Sci. Intern.: Genetics. 2008. V. 2. P. 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2008.01.003>
21. Hamlin B.C., Erin P., Meredith E.P. et al. OdoPlex: An STR multiplex panel optimized and validated for forensic identification and sex determination of North American mule deer (*Odocoileus hemionus*) and white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) // Forensic Sci. Intern.: Animals and Environments. 2021. V. 1. P. 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.fsiae.2021.100026>
22. Szabolcsi Z., Egyed B., Zenke P. et al. Constructing STR multiplexes for individual identification of Hungarian red deer // J. Forensic Sci. 2014. V. 59. № 4. P. 1090–1099. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12403>
23. Rębala K., Nedzwetskaya D.E., Kotova S.A. Forensic STR typing of European elk (moose) and European roe deer reveals contrasting patterns of genetic structure of the two cervids in Belarus // Russ. J. Genet. 2022. in press.
24. Rębala K., Rabtsava A.A., Kotova S.A. et al. STR profiling for discrimination between wild and domestic swine specimens and between main breeds of domestic pigs reared in Belarus // PLoS One. 2016. V. 11. № 11. P. 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166563>
25. SWGDAM, Scientific Working Group on DNA Analysis Methods, Recommendations of the SWGDAM Ad Hoc Working Group on Genotyping Results Reported as Likelihood Ratios, SWGDAM, 2018. P. 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.02.008>
26. Ogden R., Linacre A. Wildlife forensic science: A review of genetic geographic origin assignment // Forensic Sci. Intern. Genet. 2015. V. 18. P. 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.02.008>

Informative Relevance of 11 Microsatellite Loci for Forensic DNA-Identification of Wild and Farm American Mink (*Mustela vison*) in Belarus

V. M. Lukashkova^{a, *}, A. A. Spivak^a, and S. A. Kotova^a

^a*Scientific and Practical Center of the of the State Committee of Forensic Examinations of the Republic of Belarus, Minsk, 220114 Republic of Belarus*

^{*}*e-mail: l22805@tut.by*

American mink is involved in economic activity of the Republic of Belarus since it belongs to resource hunting species as well as breeds for fur production. We propose identification test system consisting of 11 microsatellite DNA loci designed for forensic investigation of cases of illegal hunting and animals stealing for precious furs. Informative relevance of the test system studied using two samples of farm minks and a sample from a wild population of *M. vison* geographically isolated from fur farms. The significant genetic differences between wild and farmed minks ($F_{st} = 0.04397$, $P < 0.05$) showed with random match probabilities of 11-locus genotypes calculated with and without taking into account the F_{st} value differing by two orders (1.84×10^{-8} and 1.39×10^{-10} respectively). As concerned to forensic DNA analysis, the reference databases should be formed for wild and farm animals separately.

Keywords: American mink, DNA markers, identification, genetic diversity, allele frequencies, reference database.

ПОЛИМОРФИЗМ ЛОКУСА rs1815739 ГЕНА *ACTN3* И ВЛИЯЮЩЕГО НА ЕГО ЭКСПРЕССИЮ *cis*-eQTL rs11227639 В ПОПУЛЯЦИЯХ СИБИРИ

© 2023 г. Б. А. Малярчук¹, *, **, М. В. Деренко¹, Г. А. Денисова¹

¹Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Магадан, 685000 Россия

*e-mail: malyarchuk@ibpn.ru

**e-mail: malbor@mail.ru

Поступила в редакцию 07.06.2022 г.

После доработки 19.07.2022 г.

Принята к публикации 02.08.2022 г.

Исследован полиморфизм локуса rs1815739 гена *ACTN3* и влияющего на его экспрессию *cis*-eQTL rs11227639 в популяциях северной (чукчи, коряки, эвены и эвенки) и южной (буряты, алтайцы и тувинцы) частей Сибири. Показано, что частоты аллеля rs1815739-С гена *ACTN3* (соответствует аминокислотному варианту 577R) и регуляторного аллеля rs11227639-А, повышающего уровень экспрессии этого гена, значимо выше на севере, чем на юге Сибири. Аналогично в северном направлении растет частота комбинации генотипов СС/АА по этим локусам. Выявленная картина географического распространения аллелей и генотипов по локусам rs1815739 и rs11227639 в популяциях Сибири может быть обусловлена адаптацией к холодному климату и процессами терморегуляции организма при воздействии холода. Предполагается, что повышение частот аллелей rs1815739-С и rs11227639-А у коренного населения севера Сибири связано с возрастанием роли сократительного термогенеза при адаптации к воздействию холода, а также способствует увеличению мышечной массы у их носителей, что снижает потери тепла в условиях Севера.

Ключевые слова: ген *ACTN3*, α -актинин-3, *cis*-eQTL варианты, генофонд, адаптация популяций, Сибирь.

DOI: 10.31857/S0016675823040082, **EDN:** AWDUOE

В регуляции экспрессии генов задействованы различные регуляторные элементы, включая геномные локусы, влияющие на количественные изменения в профиле экспрессии генов (eQTL, the expression quantitative trait loci) [1]. Из них самыми распространенными являются так называемые *cis*-eQTL, которые расположены, в основном, в некодирующих последовательностях ДНК на расстоянии от нескольких тысяч до миллиона пар нуклеотидов от регулируемого ими гена [1]. Благодаря проекту GTEx (Genotype Tissue Expression) в настоящее время известно большое количество генетических локусов, контролирующих экспрессию разных генов в различных тканях человека [2]. *Cis*-eQTL представляют большой интерес в плане познания механизмов адаптации человека к условиям природной среды, поскольку регуляторные участки генома могут быть мишенями отбора в популяциях человека [3, 4]. Одним из таких *cis*-eQTL является локус rs11227639 – межгенный вариант, влияющий на экспрессию гена *ACTN3* в скелетной мускулатуре [3]. Согласно данным проекта GTEx, регуляторный аллель rs11227639-А повышает уровень экспрессии гена *ACTN3* в скелетных мышцах, а популяционно-генетические

исследования показали, что максимальные мировые частоты этого аллеля наблюдаются у населения Сибири [3].

Ген *ACTN3* кодирует α -актинин-3 – структурный белок быстросокращающихся мышечных волокон. Известно, что из-за стоп-кодона R577X, приводящего к преждевременной терминации белкового синтеза, α -актинин-3 отсутствует примерно у 18% человек на планете [4]. Это связано с нонсенс-мутацией в локусе rs1815739 гена *ACTN3*. Ранее считалось, что частота аллеля rs1815739-Т (или 577X) повышается в направлении от Африки к северу Евразии и далее в Америке, что объяснялось действием отбора, направленного на повышение эффективности метаболизма, выносливости и устойчивости к холоду, и могло иметь адаптивное значение при расселении древних людей [5–9]. Однако результаты проведенного недавно реанализа географического распределения аллелей локуса rs1815739 у современного и древнего населения планеты показали, что частота аллеля rs1815739-Т в популяциях не коррелирует ни с географической широтой, ни с температурой [10]. Более того, частота аллеля rs1815739-Т на крайнем северо-востоке Азии почти в три раза ниже, чем

на юге этого материка [10]. В пределах Сибири также выявлена тенденция к уменьшению частоты этого варианта к северу [3, 11]. Таким образом, характер распространения аллеля rs1815739-*T* среди коренного населения Сибири может и не быть связанным с адаптацией к холоду, несмотря на результаты недавних исследований, показавших более высокую устойчивость к холоду носителей генотипа rs1815739-*TT* (соответствует 577XX) в сравнении с *CC* (или 577RR) индивидуумами [9].

Кроме этого, установлено, что варианты полиморфизма в локусе rs1815739 гена *ACTN3* проявляют эпистатическое взаимодействие с *cis*-eQTL rs11227639, влияющим на экспрессию гена *ACTN3* [3]. Наиболее высокая частота регуляторного аллеля rs11227639-*A* была отмечена на северо-востоке Сибири, а по результатам статистического анализа (тесты Δ DAF, iHS, LD) поддержанию высокой частоты этого генетического варианта на Северо-Востоке способствовал положительный отбор [3]. Между тем, общим недостатком отмеченных выше положений об особенностях полиморфизма локусов rs11227639 и rs1815739 в популяциях Сибири являются малые размеры выборок и относительно небольшой набор исследованных популяций. Результаты настоящей работы в некоторой степени восполняют этот пробел.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованы выборки коренного населения Сибири: эвенки ($N = 72$) из различных поселков Эвенкийского района Красноярского края, буряты ($N = 100$) из различных районов Бурятии, алтайцы ($N = 128$) из различных районов Республики Алтай, тувинцы ($N = 100$) из различных районов Республики Тыва, коряки ($N = 90$) и эвены ($N = 73$) из Северо-Эвенского р-на Магаданской обл., чукчи ($N = 14$) из Чукотского автономного округа (г. Анадырь).

Выделение и очистку геномной ДНК проводили как описано нами ранее [11]. Генотипирование локуса rs11227639 выполняли с помощью секвенирования ДНК по Сэнгеру с использованием набора для циклического секвенирования ДНК Big-Dye Terminator (Applied Biosystems v. 3.1) и генетического анализатора ABI Prism 3500xL (Applied Biosystems). Участок ДНК, включающий в свой состав полиморфный локус rs11227639 (позиция 66753650 хромосомы 11, замена G→A), амплифицировали с помощью пары олигонуклеотидных праймеров F2 (5'-AGCTCACCTTGGCTGGTCTT-3') и R2 (5'-TAACCTTGCCTTTCTCAGGGC-3'). Нуклеотидные последовательности праймеров подобраны с помощью программы Primer3 [12].

Данные о полиморфизме локуса rs1815739 гена *ACTN3* в популяциях Сибири были получены нами ранее [11], а в настоящей работе увеличены

размеры выборок для коряков и эвенков. ПЦР-амплификацию и секвенирование локуса rs1815739 проводили как описано нами ранее [11]. Анализируемая замена C→T в локусе rs1815739 (позиция 66328095 хромосомы 11) находится, таким образом, на расстоянии примерно 425 тыс. пар нуклеотидов от *cis*-eQTL rs11227639, регулирующего экспрессию гена *ACTN3*.

Для анализа нуклеотидных последовательностей участков, включающих локусы rs11227639 и rs1815739, использовали пакет программ MEGA5 [13]. Распределение аллелей и генотипов, гетерозиготность и генетическую дифференциацию популяций, а также неравновесие по сцеплению между вариантами полиморфизма локусов rs11227639 и rs1815739, исследовали с помощью пакета программ Arlequin 3.01 [14]. Отклонение от равновесия Харди–Вайнберга в популяциях и различия в частотах аллелей и генотипов оценивали с помощью точного теста Фишера. Для сравнительного анализа сопоставляли частоты аллелей и генотипов локусов rs11227639 и rs1815739 в популяциях юга и севера Сибири. В северную группу популяций вошли чукчи, коряки, эвены и эвенки, проживающие на уровне 59°–64° с.ш.; в южную группу вошли тувинцы, алтайцы и буряты, проживающие на уровне 50°–51° с.ш. Таким образом, группы популяций разделены примерно на 10° по широте проживания.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования полиморфизма локуса rs11227639 в популяциях коренного населения Сибири показали, что частота регуляторного аллеля rs11227639-*A*, повышающего экспрессию гена *ACTN3*, в Сибири находится на уровне мирового максимума, составляя 48.6% (для $N = 569$). В других региональных группах мира частота аллеля rs11227639-*A* варьирует от 9 до 27%, и с более высокими значениями этот вариант полиморфизма обнаружен в популяциях Восточной Азии (от 20 до 27% по данным проекта dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>)).

В популяциях Сибири частота регуляторного аллеля rs11227639-*A* изменяется в диапазоне от 32.8% у бурят до 65.5% у коряков (табл. 1). Только у тувинцев значимости отклонения от равновесия Харди–Вайнберга оказалась пограничной ($P = 0.046$). При сопоставлении популяций юга и севера Сибири обнаружены статистически значимые различия по частотам как аллелей, так и гомозиготных генотипов (табл. 2). Частота регуляторного аллеля rs11227639-*A* и генотипа rs11227639-*AA* оказалась значимо выше на севере, чем на юге Сибири.

Исследование полиморфизма локуса rs1815739 гена *ACTN3* показало, что частота функциональ-

Таблица 1. Частоты генотипов и аллелей локуса rs11227639 гена *ACTN3* в популяциях Сибири

Популяция (<i>N</i>)	Генотипы			Аллели		H_e	P
	<i>GG</i>	<i>GA</i>	<i>AA</i>	<i>G</i>	<i>A</i>		
Чукчи (14)	0.214	0.571	0.214	0.5	0.5	0.519	1.0
Коряки (84)	0.107	0.476	0.417	0.345	0.655	0.455	0.81
Эвены (72)	0.181	0.458	0.361	0.41	0.59	0.487	0.63
Эвенки (72)	0.194	0.444	0.361	0.417	0.583	0.49	0.47
Буряты (99)	0.424	0.495	0.081	0.672	0.328	0.443	0.26
Алтайцы (128)	0.383	0.508	0.109	0.637	0.363	0.467	0.45
Тувинцы (100)	0.29	0.4	0.31	0.49	0.51	0.502	0.046

Примечание. H_e — ожидаемая гетерозиготность, P — статистическая значимость отклонения от равновесия Харди–Вайнберга (достоверно при $P < 0.05$).

Таблица 2. Различия по частотам генотипов и аллелей локуса rs11227639 гена *ACTN3* в популяциях севера и юга Сибири

Популяции (<i>N</i>)	Генотипы			Аллели	
	<i>GG</i>	<i>GA</i>	<i>AA</i>	<i>G</i>	<i>A</i>
Север Сибири (242)	0.161	0.467	0.372	0.395	0.605
Юг Сибири (327)	0.367	0.471	0.162	0.602	0.398
P (точный тест Фишера)	$<10^{-6}$	0.93	$<10^{-6}$	$<10^{-6}$	$<10^{-6}$

Примечание. В северную группу сибирских популяций вошли чукчи ($N = 14$), коряки ($N = 84$), эвены ($N = 72$) и эвенки ($N = 72$), в южную группу вошли буряты ($N = 99$), алтайцы ($N = 128$) и тувинцы ($N = 100$).

ного аллеля rs1815739-*C* у коренного населения Сибири составляет 56.2% (для $N = 577$). Эта величина находится на уровне частот, характерных для населения Европы и Восточной Азии (примерно 56–57% по данным проекта dbSNP). Наиболее высокие частоты аллеля rs1815739-*C* зарегистрированы у чукчей, коряков и эвенов (табл. 3). Примечательно, что, как и в случае локуса rs11227639, по распределению аллелей и генотипов локуса rs1815739 наблюдаются статистически значимые различия между группами северных и южных по-

пуляций Сибири (табл. 4). Частоты функционального аллеля rs1815739-*C* и гомозиготы rs1815739-*CC* достоверно выше на севере, чем на юге Сибири. Таким образом, вопреки гипотезе об отборе нефункционального варианта rs1815739-*T* гена *ACTN3* в процессе заселения севера Евразии [5–7], в популяциях северной части Сибири частоты этого аллеля ниже, чем на юге Сибири.

Результаты проведенного исследования показали, что пониженные частоты генотипа rs1815739-*TT* могут наблюдаться в популяциях не только на се-

Таблица 3. Частоты генотипов и аллелей локуса rs1815739 гена *ACTN3* в популяциях Сибири

Популяция (<i>N</i>)	Генотипы			Аллели		H_e	P
	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	<i>C</i>	<i>T</i>		
Чукчи (14)	0.5	0.429	0.071	0.714	0.286	0.423	1.0
Коряки (90)	0.389	0.544	0.067	0.661	0.339	0.451	0.06
Эвены (73)	0.342	0.534	0.123	0.61	0.39	0.479	0.46
Эвенки (72)	0.222	0.694	0.083	0.569	0.431	0.494	0.0006
Буряты (100)	0.23	0.51	0.26	0.485	0.515	0.502	1.0
Алтайцы (128)	0.328	0.438	0.234	0.547	0.453	0.498	0.21
Тувинцы (100)	0.08	0.86	0.06	0.51	0.49	0.502	$<10^{-5}$

Примечание. H_e — ожидаемая гетерозиготность, P — статистическая значимость отклонения от равновесия Харди–Вайнберга (достоверно при $P < 0.05$).

Таблица 4. Различия по частотам генотипов и аллелей локуса rs1815739 гена *ACTN3* в популяциях севера и юга Сибири

Популяции (<i>N</i>)	Генотипы			Аллели	
	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	<i>C</i>	<i>T</i>
Север Сибири (249)	0.333	0.578	0.088	0.622	0.378
Юг Сибири (328)	0.216	0.588	0.195	0.517	0.483
<i>P</i> (точный тест Фишера)	0.0023	0.86	0.00036	0.0004	0.0004

Примечание. В северную группу сибирских популяций вошли чукчи (*N* = 14), коряки (*N* = 90), эвены (*N* = 73) и эвенки (*N* = 72), в южную группу вошли буряты (*N* = 100), алтайцы (*N* = 128) и тувинцы (*N* = 100).

вере — у чукчей и коряков, но и на юге Сибири. Так, гомозиготы rs1815739-*TT* выявлены всего лишь у 6% тувинцев (табл. 3). Вместе с тем, у тувинцев обнаружен избыток гетерозигот, что проявилось в отклонении от равновесия Харди–Вайнберга. Аналогичное смещение в сторону гетерозиготных генотипов обнаружено и у эвенков (табл. 3).

Результаты исследования показали, таким образом, что на севере Сибири наблюдаются наиболее высокие частоты функционального аллеля rs1815739-*C* и регуляторного *cis*-eQTL аллеля rs11227639-*A* (табл. 2, табл. 4). В популяциях Сибири указанные аллели довольно хорошо коррелируют друг с другом по частоте (коэффициент корреляции Пирсона $r = 0.77$). Подобная корреляция ($r = 0.8$) отмечалась также ранее для региональных групп Сибири [3]. Анализ неравновесия по сцеплению (LD) между аллелями локусов rs1815739 и rs11227639 позволил выявить наиболее высокие значения LD у чукчей ($r^2 = 0.4$, $D' = 1.0$) и коряков ($r^2 = 0.47$, $D' = 0.68$). В остальных популяциях значения r^2 варьировали от 0.18 у бурят до 0.3 у эвенков, значения D' варьировали от 0.48 у тувинцев до 0.64 у алтайцев. Проведенный ранее анализ [3] также показал, что наиболее высокие значения LD между локусами rs1815739 и rs11227639 ($r^2 = 0.63$, $D' = 0.79$) наблюдаются у населения Северо-Восточной Сибири (у чукчей, коряков и эскимосов).

В табл. 5 приводятся распределения частот различных комбинаций генотипов по локусам rs1815739 и rs11227639. Как видно, у коренного населения Сибири встречаются все возможные комбинации генотипов, за исключением *TT/AA*, в которой два аллеля локуса rs11227639 повышали бы экспрессию нефункционирующего из-за стоп-кодона гена *ACTN3*. Во всех исследованных популяциях наиболее частой является комбинация гетерозигот *CT/GA*, в которой на один функциональный аллель гена *ACTN3* приходится один регуляторный аллель rs11227639-*A*. При сопоставлении популяций севера и юга Сибири установлено, что статистически значимые различия выявляются по нескольким комбинациям локусов (табл. 6). На севере Сибири намного чаще наблюдается комби-

нация *CC/AA*, где на каждый функциональный аллель rs1815739-*C* приходится по одному регуляторному аллелю rs11227639-*A*, что, по-видимому, обеспечивает максимальную экспрессию гена *ACTN3*. При сравнении частот комбинации генотипов *CT/AA* в группах населения Сибири достоверные различия не выявлены, но по данным табл. 5 видно, что в северной группе частота *CT/AA* намного выше, чем у бурят и алтайцев, но несколько ниже, чем у тувинцев. Последние, как отмечалось выше, характеризуются избытком гетерозигот rs1815739-*CT*, относительно которых различные генотипы по локусу rs11227639 распределены довольно равномерно (табл. 5). Таким образом, судя по распространенности комбинации генотипов *CT/AA* в популяциях, по всей видимости, наличие двух регуляторных аллелей rs11227639-*A* и одного функционального аллеля rs1815739-*C* не приводит к сверхэкспрессии гена *ACTN3*, которая, как отмечалось ранее [15], может быть вредна для функционирования скелетных мышц. На юге Сибири значимо чаще распространены комбинации генотипов *CT/GG*, *TT/GG* и *CC/GG*, характеризующиеся относительно низким уровнем экспрессии гена *ACTN3* (табл. 6). В целом, анализ генетической дифференциации популяций по распределению вариантов полиморфизма локусов rs1815739 и rs11227639 показал, что популяции севера и юга Сибири различаются статистически значимо ($F_{CT} = 4.82\%$, $F_{SC} = 0.09\%$).

Проведенное исследование показало, что в популяциях коренного населения Сибири не наблюдается повышение частоты аллеля rs1815739-*T* с юга на север, что ожидается в соответствии с гипотезой о том, что потеря α -актина-3 в мышечных волокнах (из-за стоп-кодона в гене *ACTN3*) повышает выносливость и способствует адаптации к холоду [9]. Физиологические эксперименты, действительно, показали, что гомозиготные индивидуумы rs1815739-*TT* лучше сохраняют температуру тела при погружении в холодную воду [9]. Ожидание того, что такая полезная способность, повышающая адаптивный потенциал людей, должна быть использована при заселении суровых в климатическом отношении территорий арктической и субарктической Сибири, вполне оправдано. Однако как показано в ряде исследо-

Таблица 5. Частоты комбинаций генотипов по локусам rs1815739 и rs11227639 в популяциях Сибири

Генотип	Популяции (N)						
	чукчи (14)	коряки (84)	эвены (72)	эвенки (72)	буряты (99)	алтайцы (128)	тувинцы (100)
CC/AA	0.214	0.286	0.194	0.167	0.03	0.055	0.05
CC/GA	0.214	0.083	0.125	0.042	0.131	0.18	0.03
CC/GG	0.071	0.012	0.028	0.014	0.07	0.094	0
CT/GA	0.357	0.381	0.278	0.361	0.272	0.266	0.37
CT/AA	0	0.131	0.167	0.194	0.051	0.055	0.26
CT/GG	0.071	0.036	0.083	0.139	0.182	0.117	0.23
TT/GG	0.071	0.06	0.069	0.042	0.172	0.172	0.06
TT/AA	0	0	0	0	0	0	0
TT/GA	0	0.012	0.056	0.042	0.091	0.063	0

Таблица 6. Различия по частотам комбинаций генотипов по локусам rs1815739 и rs11227639 гена *ACTN3* в популяциях севера и юга Сибири

Генотип	Север Сибири (N = 242)	Юг Сибири (N = 327)	P (точный тест Фишера)
CC/AA	0.219	0.046	$<10^{-6}$
CC/GA	0.091	0.119	0.34
CC/GG	0.021	0.058	0.034
CT/GA	0.343	0.3	0.28
CT/AA	0.153	0.116	0.21
CT/GG	0.083	0.171	0.0026
TT/GG	0.058	0.138	0.002
TT/GA	0.033	0.052	0.3

Примечание. В северную группу сибирских популяций вошли чукчи (N = 14), коряки (N = 84), эвены (N = 72) и эвенки (N = 72), в южную группу вошли буряты (N = 99), алтайцы (N = 128) и тувинцы (N = 100).

ваний [3, 11], включая настоящую работу, доля людей, обладающих функциональным геном *ACTN3*, наоборот, увеличивается в северном направлении. Более того, проведенный в настоящей работе анализ полиморфизма *cis-eQTL* rs11227639, влияющего на экспрессию гена *ACTN3*, продемонстрировал, что в северном направлении также увеличивается частота и регуляторного аллеля rs11227639-A, и комбинации генотипов CC/AA по локусам rs1815739 и rs11227639. Это позволяет предположить, что у населения севера Сибири может быть усилен уровень экспрессии гена *ACTN3*.

Относительно причин повышения частоты аллелей rs1815739-C и rs11227639-A в северном направлении предполагается, что наличие этих аллелей способствует увеличению мышечной массы у их носителей, что на севере Сибири может иметь адаптивное значение в плане снижения потери тепла [3] и соответствует правилу Бергмана [16] и концепции адаптивных типов Т.И. Алексеевой [17]. Кроме этого, α -актинин-3 играет ключевую роль в регуляции мышечного метаболизма — в частности, активности митохондриальных фер-

ментов [15], а его дефицит связан со снижением мышечной массы, повышенным риском саркопении и атрофии мышц [18]. Установлено также, что у носителей генотипа rs1815739-CC (в сравнении с TT-индивидуумами) в два раза повышен сократительный (или дрожательный) термогенез за счет усиления мышечного тонуса и дрожи [9]. Таким образом, различия в соотношениях аллелей C и T в локусе rs1815739 гена *ACTN3* в популяциях могут отражать различия в балансе сократительного и несократительного термогенеза как основных механизмов теплопродукции при воздействии холода.

Полученные нами генетические данные позволяют предположить, что в высоких широтах при адаптации к холоду, по всей видимости, возрастает роль сократительного термогенеза, что проявляется в повышенных частотах комбинации генотипов CC/AA по локусам rs1815739 и rs11227639 на севере Сибири. Физиологические реакции на воздействие холода, кроме сократительного термогенеза, включают также сужение просвета кровеносных сосудов (вазоконстрикции)

в коже, благодаря чему снижается потеря тепла организмом [19]. Проведенные ранее исследования показали, что в геномах коренного населения Северо-Востока Сибири (у эскимосов, чукчей и коряков) присутствуют отчетливые следы положительного отбора в гене *PRKG1*, который ответствен за сокращение гладкой мускулатуры сосудов [20]. Этот факт усиливает предположение о том, что особенности полиморфизма локусов rs1815739 и rs11227639 могут быть связаны с адаптацией коренного населения севера Сибири к холоду, особенно в отношении механизма сократительного термогенеза.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-00264, <https://rscf.ru/project/22-24-00264/>.

Авторы заявляют, что все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. GTEx Consortium. Genetic effects on gene expression across human tissues // *Nature*. 2017. V. 550. P. 204–213. <https://doi.org/10.1038/nature24277>
2. GTEx Consortium. The GTEx Consortium atlas of genetic regulatory effects across human tissues // *Science*. 2020. V. 369. P. 1318–1330. <https://doi.org/10.1126/science.aaz1776>
3. Mörseburg A. Investigating the role of demography and selection in genome scale patterns of common and rare variant diversity in humans. Ph. D. thesis. Cambridge: Univ. Cambr., 2018. 438 p.
4. Quiver M.H., Lachance J. Adaptive eQTLs reveal the evolutionary impacts of pleiotropy and tissue-specificity while contributing to health and disease // *Human Genet. and Genomics Adv.* 2022. V. 3. 100083. <https://doi.org/10.1016/j.xhgg.2021.100083>
5. North K.N., Yang N., Wattanasirichaigoon D. et al. A common nonsense mutation results in α -actinin-3 deficiency in the general population // *Nat. Genet.* 1999. V. 21. P. 353–354. <https://doi.org/10.1038/7675>
6. MacArthur D.G., Seto J.T., Raftery J.M. et al. Loss of function of the *ACTN3* gene alters muscle metabolism in a mouse model and has been selectively favored during recent human evolution // *Nat. Genet.* 2007. V. 39. P. 1261–1265. <https://doi.org/10.1038/ng2122>
7. Friedlander S.M., Herrmann A.L., Lowry D.P. et al. *ACTN3* allele frequency in humans covaries with global latitudinal gradient // *PLoS One*. 2013. V. 8. e52282. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052282>
8. Amorim C.E., Acuña-Alonzo V., Salzano F.M. et al. Differing evolutionary histories of the *ACTN3* R577X polymorphism among the major human geographic groups // *PLoS One*. 2015. V. 10. e0115449. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115449>
9. Wyckelsma V.L., Venckunas T., Houweling P.J. et al. Loss of α -actinin-3 during human evolution provides superior cold resilience and muscle heat generation // *Am. J. Hum. Genet.* 2021. V. 108. P. 446–457. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.01.013>
10. Mörseburg A., Pagani L., Malyarchuk B. et al. Response to Wyckelsma et al. Loss of α -actinin-3 during human evolution provides superior cold resilience and muscle heat generation // *Am. J. Hum. Genet.* 2022. V. 109. P. 967–972. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2022.03.014>
11. Маларчук Б.А., Деренко М.В., Денисова Г.А. R577X-полиморфизм альфа-актина-3 в популяциях человека на Северо-Востоке Азии // *Экол. генетика*. 2017. Т. 15. № 1. С. 50–56. <https://doi.org/10.17816/ecogen15150-56>
12. Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T. et al. Primer3 – new capabilities and interfaces // *Nucl. Ac. Res.* 2012. V. 40. P. e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
13. Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // *Mol. Biol. Evol.* 2011. V. 28. P. 2731–2739. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
14. Excoffier L., Laval G., Schneider S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis // *Evol. Bioinformatics Online*. 2007. V. 1. P. 47–50. PMID: PMC2658868.
15. Garton F.C., Houweling P.J., Vukcevic D. et al. The effect of *ACTN3* gene doping on skeletal muscle performance // *Am. J. Hum. Genet.* 2018. V. 102. P. 845–857. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.03.009>
16. Foster F., Collard M. A reassessment of Bergmann's rule in modern humans // *PLoS One* 2013. V. 8. P. e72269. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072269>
17. Алексеева Т.И. Географическая среда и биология человека. М.: Мысль, 1977. 302 с.
18. Cho J., Lee I., Kang H. *ACTN3* gene and susceptibility to sarcopenia and osteoporotic status in older Korean adults // *Biomed. Res. Int.* 2017. V. 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/4239648>
19. Castellani J.W., Young A.J. Human physiological responses to cold exposure: Acute responses and acclimatization to prolonged exposure // *Auton Neurosci.* 2016. V. 196. P. 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2016.02.009>
20. Cardona A., Pagani L., Antao T. et al. Genome-wide analysis of cold adaption in indigenous Siberian populations // *PLoS One*. 2014. V. 9. P. e98076. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098076>

Polymorphism of the rs1815739 Locus of the *ACTN3* Gene and rs11227639 *cis*-eQTL Affecting Its Expression in Populations of Siberia

B. A. Malyarchuk^{a, *, **}, M. V. Derenko^a, and G. A. Denisova^a

^a*Institute of Biological Problems of the North, Far Eastern Branch
of the Russian Academy of Sciences, Magadan, 685000 Russia*

^{*}*e-mail: malyarchuk@ibpn.ru*

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

The polymorphism of the rs1815739 locus of the *ACTN3* gene and the rs11227639 *cis*-eQTL that affects expression of this gene was studied in the populations of the northern (Chukchi, Koryaks, Evens, and Evenks) and southern (Buryats, Altaians, and Tuvinians) parts of Siberia. It was shown that the frequencies of the rs1815739-*C* allele of the *ACTN3* gene (corresponding to the 577R amino acid variant) and the rs11227639-*A* upregulating *ACTN3* allele, which increases the expression level of this gene, are significantly higher in the north than in the south of Siberia. Similarly, in the northern direction, the frequency of the combination of *CC/AA* genotypes at these loci increases. The revealed pattern of the geographical distribution of alleles and genotypes at the rs1815739 and rs11227639 loci in Siberian populations may be due to adaptation to cold and the processes of thermoregulation of the body when exposed to cold. It is assumed that an increase in the frequency of rs1815739-*C* and rs11227639-*A* alleles in the aboriginal populations of the north of Siberia is associated with an increase in the role of shivering thermogenesis during adaptation to cold exposure, and also contributes to an increase in muscle mass in their carriers, which reduces heat loss in the conditions of the North.

Keywords: *ACTN3* gene, α -actinin-3, *cis*-eQTL, gene pool, adaptation of populations, Siberia.

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА VNTR ГЕНА *AS3MT* С РИСКОМ РАЗВИТИЯ ШИЗОФРЕНИИ

© 2023 г. Г. И. Коровайцева¹, *, Т. В. Лежейко¹, И. В. Олейчик¹, В. Е. Голимбет¹, **

¹Научный центр психического здоровья, Москва, 115522 Россия

*e-mail: korovaitseva@mail.ru

**e-mail: golimbet@mail.ru

Поступила в редакцию 26.05.2022 г.

После доработки 27.06.2022 г.

Принята к публикации 20.09.2022 г.

Ген *AS3MT* кодирует метилтрансферазу мышьяка(III). VNTR-полиморфизм гена *AS3MT*, характерен только для генома человека и связан с экспрессией специфичной для человека изоформы белка *AS3MT*^{d2d3}, которая является потенциальным фактором риска развития шизофрении. Нами проведен анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфизма VNTR на большой выборке этнических русских. Изучена ассоциация VNTR с риском развития шизофрении. Анализ проводили на выборке, включающей в себя 1002 больных шизофренией и расстройствами шизофренического спектра и 1510 человек контрольной группы. Обнаружено, что у женщин, носителей генотипа *V3/V3*, риск развития шизофрении увеличивается (ОШ = 1.4, 95% ДИ: 1.11–1.77).

Ключевые слова: полиморфизм VNTR, ген *AS3MT*, шизофрения.

DOI: 10.31857/S0016675823040045, **EDN:** AVFLVA

Шизофрения является многофакторным заболеванием, причем генетический фактор играет значительную роль в развитии этого тяжелого психического расстройства [1, 2]. Проведенные полнотеломные исследования ассоциаций (GWAS от англ. genome-wide association studies) выявили множество геномных локусов, связанных с риском шизофрении в мировых популяциях [3, 4]. Показано, что большинство вариантов риска, зарегистрированных в этих локусах, расположено в некодирующих областях генома, обогащенных регуляторными элементами, которые влияют на сплайсинг или транскрипцию генов-мишеней [5, 6].

Исследования механизмов регуляции генов, связанных с подобными генетическими вариантами, проводятся систематически [7]. Однако анализ генетических ассоциаций сохраняет, на наш взгляд, свою актуальность. Анализ частотного распределения изучаемых полиморфизмов в различных популяциях позволяет охарактеризовать их генетические особенности и оценить связь заболевания с фактором риска.

Полиморфизм вариабельного числа tandemных повторов (VNTR-полиморфизм) в экзоне 1 гена *AS3MT*, кодирующего метилтрансферазу мышьяка(III), является важным функциональным элементом, влияющим на активность промотора гена. Этот VNTR-полиморфизм присутствует только в геноме человека и ассоциирован с экспрессией

специфичной для человека изоформы белка *AS3MT*^{d2d3}, являющейся потенциальным фактором риска развития шизофрении [8].

Цель настоящего исследования — анализ распределения частот генотипов VNTR-полиморфизма *AS3MT* в группе этнических русских и изучение ассоциации этого полиморфизма с риском развития шизофрении.

Общая выборка больных включала в себя 1002 человека с шизофренией и расстройствами шизофренического спектра (рубрики F20, F21, F23 и F25 по МКБ-10; средний возраст 30.8 ± 11.2 лет; 500 женщин и 502 мужчины). В выборку не включали лиц с относительно острой и тяжелой хронической соматической патологией в стадии декомпенсации. Группу контроля, которая была сопоставима по полу и возрасту с группой пациентов, составили 1510 психически здоровых человек без наследственной отягощенности психическими заболеваниями (средний возраст 29.1 ± 11.3 лет; 761 женщина и 749 мужчин). Более 95% в каждой группе являлись этническими русскими.

Геномную ДНК выделяли из венозной крови методом фенол/хлороформной экстракции. Генотипирование проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), выполненной по стандартной процедуре с небольшими модификациями на амплификаторе C1000 Touch (Bio-Rad). Использовали олигонуклеотидные праймеры: прямой

Таблица 1. Распределение частот аллелей и генотипов VNTR-полиморфизма гена *AS3MT* у больных шизофренией и здоровых индивидов

Генотип, аллель	Больные шизофренией (<i>n</i> = 1000)		Контрольная группа (<i>n</i> = 1510)	
	женщины (<i>n</i> = 492)	мужчины (<i>n</i> = 508)	женщины (<i>n</i> = 761)	мужчины (<i>n</i> = 749)
<i>V3/V3</i>	201 (0.41)*	190 (0.37)	251 (0.33)	246 (0.33)
<i>V2/V3</i>	222 (0.45)	240 (0.47)	362 (0.48)	384 (0.51)
<i>V2/V2</i>	69 (0.14)	78 (0.15)	148 (0.19)	119 (0.16)
<i>V3</i>	624 (0.63)*	620 (0.61)	864 (0.57)	876 (0.58)
<i>V2</i>	360 (0.37)	396 (0.39)	658 (0.43)	622 (0.42)

Примечание. Для каждой группы приведено количество человек с определенным генотипом/аллелем, в скобках указана частота генотипа/аллеля; * — достоверные различия частот ($p < 0.05$).

5'-ATG CTG ATA CCG ACC TCC TG-3' и обратный 5'-GGT GAG GGG AGG ACA AAG G-3'. Полученные ПЦР-фрагменты разделяли в 8%-ном полиакриламидном геле. Аллель *V2* (ПЦР-фрагмент из 419 пн) содержал две повторяющихся единицы, аллель *V3* (ПЦР-фрагмент 455 пн) — три повторяющихся единицы. Аллель *V4* включал четыре повтора, а ПЦР-фрагмент составлял 491 пн.

При анализе данных соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга оценивали с помощью критерия χ^2 . Для оценки значимости различий в распределении аллелей и генотипов полиморфного локуса в изучаемых подгруппах использовали критерий χ^2 Пирсона. Риск того или иного аллеля или генотипа в развитии шизофрении определяли с помощью показателя отношение шансов (ОШ) с 95% доверительным интервалом (ДИ). За порог статистической значимости при определении ОШ и χ^2 был принят стандартный уровень $p = 0.05$. Для анализа количественных данных применяли факторный дисперсионный анализ. Апостериорный анализ проводили с использованием поправки Бонферрони на множественность сравнений.

Молекулярно-генетическое исследование, проведенное на выборке больных шизофренией (1002 человек), показало следующее распределение генотипов VNTR-полиморфизма гена *AS3MT*: *V3/V3* — 391 (39.0%), *V2/V3* — 462 (46.1%), *V2/V2* — 147 (14.7%), *V3/V4* 2 (0.19%). Частота аллеля *V4* являлась очень низкой, поэтому мы исключили двух пациентов (один мужчина и одна женщина) с генотипами *V3/V4* из дальнейшего анализа. Выборка больных шизофренией в результате составила 1000 человек. Распределение частот генотипов в ней соответствовало равновесию Харди–

Вайнберга ($\chi^2 = 0.31$; $p = 0.59$). Частоты аллелей и генотипов у женщин и мужчин значимо не отличались. Распределение генотипов в группе здорового контроля было: *V3/V3* — 497 (32.9%), *V2/V3* — 746 (49.4%), *V2/V2* — 267 (17.7%). Распределение частот генотипов соответствовало равновесию Харди–Вайнберга ($\chi^2 = 0.2$; $p = 0.67$). Достоверных отличий частот аллелей и генотипов у женщин и мужчин в контрольной группе не обнаружено.

Анализ распределения частот аллелей и генотипов выявил достоверное увеличение частоты генотипа *V3/V3* у больных шизофренией по сравнению с контрольной группой ($\chi^2 = 10.07$, $p = 0.0015$). Для того чтобы выяснить, связано ли это различие с полом, мы проанализировали распределение частот генотипов в группах мужчин и женщин. Значения частот генотипов и аллелей у больных шизофренией и людей из контрольной группы, представлены в табл. 1.

Обнаружено значимое увеличение как частоты аллеля *V3*, так и генотипа *V3/V3* у женщин больных шизофренией по сравнению с женщинами из контрольной группы (табл. 2). Частоты аллелей и генотипов у мужчин в группах достоверно не отличались. В качестве количественной меры эффекта при сравнении данных, мы использовали показатель отношения шансов (ОШ). Полученные значения ОШ указывают на то, что наличие генотипа *V3/V3* повышает риск развития шизофрении у женщин (табл. 2).

Чтобы проверить, не влияет ли генотип риска на некоторые характеристики заболевания, мы изучали возраст начала инициальных проявлений заболевания, не достигающих уровня клинической значимости, и возраст на момент постановки диагноза у носителей различных генотипов в

Таблица 2. Оценка значимости различий в распределении аллеля *V3* и генотипа *V3/V3* VNTR-локуса гена *AS3MT* у мужчин и женщин в группах у больных шизофренией и здоровых индивидов

	Генотип <i>V3/V3</i>	Аллель <i>V3</i>
Женщины, χ^2 , <i>p</i> , ОШ (95% ДИ)	$\chi^2 = 8.03$ $p = 0.0046$ ОШ = 1.4 (ДИ: 1.11–1.77)	$\chi^2 = 10.95$ $p = 0.0009$ ОШ = 1.32 (ДИ: 1.12–1.56)
Мужчины, χ^2 , <i>p</i> , ОШ (95% ДИ)	$\chi^2 = 2.78$ $p = 0.096$ ОШ = 1.22 (ДИ: 0.97–1.55)	$\chi^2 = 1.11$ $p = 0.202$ ОШ = 1.11 (ДИ: 0.94–1.31)

Примечание. Для анализа использовали критерий χ^2 Пирсона, ОШ – отношение шансов, ДИ – 95% доверительный интервал.

Таблица 3. Возраст инициальных проявлений заболевания и возраст на момент постановки диагноза у носителей различных генотипов VNTR-локуса гена *AS3MT* в группе женщин, больных шизофренией

Клинические показатели	Генотип		
	<i>V3/V3</i>	<i>V2/V3</i>	<i>V2/V2</i>
Средний возраст начала инициальных проявлений заболевания, годы, стандартное отклонение	21.2 ± 9.9	19.9 ± 9.2	21.5 ± 10.6
Средний возраст на момент постановки диагноза, годы, стандартное отклонение	25.3 ± 10.4	25.4 ± 9.4	25.8 ± 11.21

группе женщин. Клинические характеристики в зависимости от генотипа представлены в табл. 3.

Нами обнаружено, что генотип VNTR не оказывает влияния на эти клинические показатели. Не выявлено достоверной разницы среднего возраста начала проявления клинических симптомов и возраста проявления выраженной симптоматики у носителей различных генотипов.

Исследования GWAS выявили более 270 независимых локусов риска шизофрении [9, 10]. Лocus 10q24.32-33 является одним из наиболее значимых участков генома, связанных с увеличением риска развития шизофрении как в европейских, так и в азиатских популяциях [3, 11–13]. Этот геномный район содержит блок генов, которые могут быть вовлечены в патогенез шизофрении и среди них ген *AS3MT* [8, 14, 15]. Была обнаружена специфичная только для человека изоформа *AS3MT*^{d2d3}, в которой отсутствуют экзоны 2 и 3 по сравнению с полноразмерной формой. Показано, что эта укороченная изоформа экспрессируется предпочтительно в головном мозге, при этом у больных шизо-

френией экспрессия *AS3MT*^{d2d3} значительно выше, чем у людей без психических патологий [8]. Исследования, проведенные на выборках европейцев, афроамериканцев и азиатов показали, что функциональным полиморфизмом, влияющим не только на активность промотора гена *AS3MT*, но и на экспрессию уникальной изоформы *AS3MT*^{d2d3}, является варибельное число tandemных повторов в экзоне 1 гена *AS3MT* [8, 16]. В дальнейшем изучение VNTR-полиморфизма гена *AS3MT* вели в различных направлениях: анализировали связь VNTR с когнитивными нарушениями, характерными для шизофрении [17], определяли, регулирует ли этот полиморфизм напрямую альтернативный сплайсинг, приводящий к образованию уникальной изоформы *AS3MT*^{d2d3} [16]. Однако до сих пор, как это ни удивительно, не проводили анализ ассоциации вариантов VNTR с риском развития шизофрении в исследованиях “случай–контроль”. Кроме того, частоты аллелей и генотипов VNTR-полиморфизма гена *AS3MT* определяли на очень небольших выборках. Так, например одни авторы анализируют

вали 60 афроамериканцев и 60 европейцев [18], другие — 93 человека из китайской популяции [17]. Небольшой размер выборок был связан с тем, что цели и методы исследований ограничивали авторов в количестве анализируемых образцов.

Определяя частоты аллелей и генотипов данного полиморфного локуса, мы впервые провели анализ на большой выборке этнических русских (1510 психически здоровых человек). Следует отметить, что определенные нами частоты гетерозиготы $V2/V3$ (49.4%) и гомозиготы $V3/V3$ (32.9%) отличались от значений, полученных ранее другими авторами для европейцев: частота встречаемости $V2/V3$ (38.3%) была ниже $V3/V3$ (43.3%) [18]. Возможно это отличие вызвано тем, что группа, на которой авторы проводили исследование, была невелика и включала всего 60 человек. В то же время частоты генотипов в выборках китайской популяции ($V2/V3$ — 50.5% и $V3/V3$ — 25.8%) и афроамериканцев ($V2/V3$ — 43.3% и $V3/V3$ — 33.3%) были сравнимы с полученными нами результатами [17, 18]. В 2006 г. С. Wood с соавт. опубликовали результаты исследования, согласно которым полиморфизм VNTR $AS3MT$ является триаллельным у афроамериканцев (аллели с двумя, тремя и четырьмя повторами) и дуаллельным у европейцев (два и три повтора) [18]. В нашей работе в группе контроля (1510 человек) ни одного носителя аллеля $V4$ обнаружено не было. Однако анализ генотипов выборки больных шизофренией (1002 человека) выявил двух носителей $V3/V4$. У нас была возможность исследовать ДНК родителей одного из этих пациентов. Оказалось, что мать больного, не имеющая симптомов какого-либо психического расстройства, также является носителем этого аллеля. Такое отличие генотипических характеристик разлитых европейских популяций может быть объяснено либо мутацией *de novo*, либо очень низкой частотой $V4$, в результате чего этот аллель может быть обнаружен только в крупных выборках. Интересно, что при анализе небольшой выборки китайской популяции авторы также обнаружили образцы с аллелем, несущим четыре повтора, и его частота составляла 1.5% [17]. Таким образом, нельзя утверждать, что аллель $V4$ присутствует только у африканцев и полностью отсутствует в популяциях Европы и Азии. Однако его частота в последних значительно ниже.

Проведенный нами анализ ассоциаций вариантов VNTR гена $AS3MT$ в исследованиях “случай—контроль” в группе этнических русских выявил связь генотипа $V3/V3$ с риском развития шизофрении. Полученные в настоящей работе результаты согласуются с данными исследований других авторов. Так, известно об увеличении уровня экспрессии специфичной изоформы $AS3MT^{d2d3}$ в мозге больных шизофренией, носителей аллеля с тремя VNTR-повторами [8, 16]. Помимо этого, имеются данные о нарушении пластичности префронтальной

кору у людей с аллелем $V3$ [17]. По мнению авторов статьи, это может объяснить механизм вклада VNTR $AS3MT$ в развитие шизофрении, учитывая то, что у больных наблюдается задержка развития некоторых областей мозга, включая префронтальную кору [19, 20]. Кроме того, Х. Саи с соавт. в 2021 г. обнаружили, что повышенная экспрессия $AS3MT^{d2d3}$, на которую влияет VNTR-полиморфизм гена $AS3MT$, значительно снижает плотность грибовидных дендритных шипиков [16]. Являясь наиболее зрелым типом шипиков, они отвечают за синаптическую пластичность и долговременную память [21], а потому являются важным эндотипом шизофрении. Во всех этих исследованиях продемонстрировано потенциальное регулирующее влияние VNTR $AS3MT$ на риск развития шизофрении и роль аллеля $V3$ в этом процессе.

В настоящей работе мы показали, что $V3/V3$ повышает риск шизофрении у женщин, но не является фактором риска у мужчин. Значение показателя ОШ свидетельствует о том, что изучаемый полиморфизм вносит определенный вклад в риск развития заболевания, хотя и не обладает большим самостоятельным эффектом. Ранее мы изучали влияние генотипов VNTR на выраженность симптомов шизофрении в группах с родовыми осложнениями и без них, учитывая фактор пола [22]. Примечательно, что определенные закономерности также были выявлены в группе женщин: у носителей генотипа $V2/V2$ при наличии родовых осложнений отмечено увеличение средних балльных значений негативных симптомов, что связано с плохим прогнозом заболевания.

Наши исследования показали, что генотип $V3/V3$ влияет на риск развития шизофрении, но не связан с тяжестью заболевания. В то время как гомозигота по аллелю $V2$ оказывает влияние на тяжесть заболевания, увеличивая негативную симптоматику, но только у женщин и только при взаимодействии с дополнительным фактором — родовыми осложнениями. Таким образом, роль VNTR-полиморфизма гена $AS3MT$ в опосредовании развития шизофрении и связанных с ней патологических изменений очевидна. Однако мы видим, что существуют отличия в том, как этот полиморфизм влияет на развитие и протекание заболевания у мужчин и женщин. Кроме того, необходимо учитывать возможное наличие ряда других генетических и средовых факторов, которые при взаимодействии с VNTR $AS3MT$ могут определять особенности развития и протекания шизофрении.

Итак, в настоящей работе нами впервые было изучено распределение частот аллелей и генотипов VNTR $AS3MT$ на большой выборке этнических русских и показана ассоциация данного VNTR-полиморфизма с риском развития шизофрении. Мы обнаружили, что женщины, носители генотипа

V3/V3, имеют повышенный риск развития заболевания.

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

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Riley B., Kendler K.S. Molecular genetic studies of schizophrenia // *Eur. J. Hum. Genet.* 2006. V. 14. № 6. P. 669–680. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201571>
- Marder S.R., Cannon T.D. Schizophrenia. // *N. Engl. J. Med.* 2019. V. 381. № 18. P. 1753–1761. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1808803>
- Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci // *Nature.* 2014. V. 511. P. 421–427. <https://doi.org/10.1038/nature13595>
- Lam M., Chen C.Y., Li Z. et al. Comparative genetic architectures of schizophrenia in East Asian and European populations // *Nat. Genet.* 2019. V. 51. № 12. P. 1670–1678. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0512-x>
- Jaffe A.E., Straub R.E., Shin J.H. et al. Developmental and genetic regulation of the human cortex transcriptome illuminate schizophrenia pathogenesis // *Nat. Neurosci.* 2018. V. 21. № 8. P. 1117–1125. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0197-y>
- Takata A., Matsumoto N., Kato T. Genome-wide identification of splicing QTLs in the human brain and their enrichment among schizophrenia-associated loci // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 14519–14529. <https://doi.org/10.1038/ncomms14519>
- Huo Y., Li S., Liu J. et al. Functional genomics reveal gene regulatory mechanisms underlying schizophrenia risk // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 670–688. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08666-4>
- Li M., Jaffe A.E., Straub R.E. et al. A human-specific *AS3MT* isoform and *BORCS7* are molecular risk factors in the 10q24.32 schizophrenia-associated locus // *Nat. Med.* 2016. V. 22. № 6. P. 649–656. <https://doi.org/10.1038/nm.4096>
- Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, Ripke S., Walters J.T., O'Donovan M.C. Mapping genomic loci prioritises genes and implicates synaptic biology in schizophrenia // *MedRxiv.* 2020.09.12. <https://doi.org/10.1101/2020.09.12.20192922>
- Trubetskoy V., Pardiñas A.F., Qi T. et al. Mapping genomic loci implicates genes and synaptic biology in schizophrenia // *Nature.* 2022. Apr 8. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04434-5>
- Li L., Chang H., Huang T. et al. Recent positive selection drives the expansion of a schizophrenia-associated variant within 10q24.33 in human populations through its pleiotropic effects on diverse human complex traits // *J. Psychiatry Brain Sci.* 2017. V. 2. № 1. P. 1–17. <https://doi.org/10.20900/jpbs.20170001>
- Yu H., Yan H., Li J. et al. Common variants on 2p16.1, 6p22.1 and 10q24.32 are associated with schizophrenia in Han Chinese population // *Mol. Psychiatry.* 2017. V. 22. № 7. P. 954–960. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.212>
- Xiao X., Luo X.J., Chang H. et al. Evaluation of European schizophrenia GWAS loci in Asian populations via comprehensive meta-analyses // *Mol. Neurobiol.* 2017. V. 54. № 6. P. 4071–4080. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9990-3>
- Duarte R.R.R., Troakes C., Nolan M. et al. Genome-wide significant schizophrenia risk variation on chromosome 10q24 is associated with altered cis-regulation of *BORCS7*, *AS3MT*, and *NT5C2* in the human brain // *Am. J. Med. Genet. (part B Neuropsychiatr. Genet.)*. 2016. V. 171. № 6. P. 806–814. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32445>
- Guan F., Zhang T., Li L. et al. Two-stage replication of previous genome-wide association studies of *AS3MT*-*CNNM2*-*NT5C2* gene cluster region in a large schizophrenia case-control sample from Han Chinese population // *Schizophrenia Research.* 2016. V. 176. P. 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2016.07.004>
- Cai X., Yang Z.H., Li H.J. et al. A human-specific schizophrenia risk tandem repeat affects alternative splicing of a human-unique isoform *AS3MT*^{d2d3} and mushroom dendritic spine density // *Schizophr. Bull.* 2021. V. 47. № 1. P. 219–227. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbaa098>
- Zhao W., Zhang Q., Chen X. et al. The VNTR of the *AS3MT* gene is associated with brain activations during a memory span task and their training-induced plasticity // *Psychol. Med.* 2021. V. 51. № 11. P. 1927–1932. <https://doi.org/10.1017/S0033291720000720>
- Wood T.C., Salavagionne O.E., Mukherjee B. et al. Human arsenic methyltransferase (*AS3MT*) pharmacogenetics: gene resequencing and functional genomics studies // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 11. P. 7364–7373. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512227200>
- Li X., Xiao Y., Zhao Q. et al. The neuroplastic effect of working memory training in healthy volunteers and patients with schizophrenia: Implications for cognitive rehabilitation // *Neuropsychologia.* 2015. V. 75. P. 149–162. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2015.05.029>
- Thermenos H.W., Keshavan M.S., Juelich R.J. et al. A review of neuroimaging studies of young relatives of individuals with schizophrenia: a developmental perspective from schizotaxia to schizophrenia // *Am. J. Med. Genet. (part B Neuropsychiatr. Genet.)*. 2013. V. 162. № 7. P. 604–635. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32170>
- Berry K.P., Nedivi E. Spine dynamics: Are they all the same? // *Neuron.* 2017. V. 96. № 1. P. 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.08.008>
- Korovaitseva G.I., Gabaeva M.V., Yunilainen O.A., Golimbet V.E. Effect of VNTR polymorphism of the *AS3MT* gene and obstetrical complications on the severity of schizophrenia // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2019. V. 168. № 1. P. 84–86. <https://doi.org/10.1007/s10517-019-04653-3>

Association of VNTR Polymorphism of the *AS3MT* Gene with the Risk of Schizophrenia**G. I. Korovaitseva^{a, *}, T. V. Lezheiko^a, I. V. Oleichik^a, and V. E. Golimbet^{a, **}**^a*Mental Health Research Centre, Moscow, 115522 Russia*^{*}*e-mail: korovaitseva@mail.ru*^{**}*e-mail: golimbet@mail.ru*

The *AS3MT* gene encodes arsenic(III) methyltransferase. VNTR polymorphism of the *AS3MT* gene is characteristic only for the human genome. It is associated with the expression of a human-specific *AS3MT*^{d2d3} protein isoform, which is a potential risk factor for the development of schizophrenia. In this study, we for the first time have analyzed the distribution of frequencies of alleles and genotypes of VNTR polymorphism in a large sample of ethnic Russians. The association of VNTR with the risk of schizophrenia has been studied. The study included 1002 patients with schizophrenia and schizophrenia spectrum disorders and 1510 people of the control group. Women with the *V3/V3* genotype have an increased risk of schizophrenia (OR = 1.4, 95% CI: 1.11–1.77).

Keywords: VNTR polymorphism, *AS3MT* gene, schizophrenia.

НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ “ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ПОПУЛЯЦИЯХ” (МОСКВА, 11–14 ОКТЯБРЯ 2022 г.)

© 2023 г. Д. В. Политов¹, *, Е. А. Мудрик¹

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

*e-mail: dmitri.p17@gmail.com

DOI: 10.31857/S0016675823040094, EDN: AWEOTQ

С 11 по 14 октября 2022 г. в Москве, в Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, прошла Научная конференция “Генетические процессы в популяциях”, посвященная 50-летию основания лаборатории популяционной генетики им. академика Ю.П. Алтухова и 85-летию со дня рождения Юрия Петровича Алтухова (1936–2006). Она стала третьей в череде мероприятий, связанных с именем выдающегося ученого Ю.П. Алтухова и юбилеями созданной им в 1972 г. лаборатории. Первая конференция “Проблемы популяционной и общей генетики” и ее молодежный сателлит “Популяционная генетика: современное состояние и перспективы” состоялись в ИОГен РАН в 2011 г. [1]; вторая – “Генетика популяций: прогресс и перспективы” – была проведена на базе Звенигородской биологической станции МГУ в 2017 г. [2]. Конференции организованы с целью представления научного наследия академика Ю.П. Алтухова и достижений его научной школы, обсуждения состояния и перспектив популяционной и общей генетики в России и в мире, роли молекулярно-генетических методов в оценке биоразнообразия и выявлении факторов, определяющих генетические процессы в популяциях растений, животных и человека.

В конференции 2022 г., символически начавшейся в день рождения Юрия Петровича – 11 октября, приняли очное участие 126 ученых из ведущих академических, образовательных, научно-исследовательских и научно-производственных учреждений России (Москва, Санкт-Петербург, Владивосток, Иркутск, Новосибирск, Екатеринбург, Томск, Петрозаводск, Биробиджан, Кемерово, Пермь, Новокузнецк, Ростов-на-Дону, Уфа, Петропавловск-Камчатский, Мытищи, Обнинск, Подольск), Белоруссии (Минск, Гомель) и Германии (Гёттинген). В течение четырех дней участниками было представлено 13 пленарных, 68 устных и 12 стендовых докладов, посвященных исследованиям генетических процессов в популяциях животных, растений и человека, а также механизмам видообразования.

Пленарная научно-мемориальная сессия была приурочена к 50-летию юбилею лаборатории популяционной генетики (Д.В. Политов) и работам, восходящим к научным идеям Ю.П. Алтухова: дивергенции миграционно-связанных популяций дрозофилы (Е.Я. Фрисман) и промысловому районированию дальневосточных лососевых рыб (Л.А. Животовский). Пленарные доклады по растительным объектам охватывали вопросы эффективного подхода к исследованию мтДНК в пределах рода на примере пихт (В.Л. Семериков), адаптивной генетической структуры популяций комплекса европейской и сибирской елей (Д.В. Политов) и новой междисциплинарной области изучения адаптивного генетического потенциала лесных древесных популяций – дендрогеномики (К.В. Крутовский).

Пленарный доклад по генетическим процессам в популяциях животных был посвящен структуре и разнообразию генофонда северного оленя Евразии по мтДНК и гену прионного белка (М.В. Холодова). Пленарные доклады по генетическим процессам в популяциях человека суммировали итоги исследований гиперметилирования промоторов генов в лейкоцитах облученных людей (А.В. Рубанович) и динамики частот гаплогрупп Y-хромосомы и мтДНК в мегаполисе под действием миграционных процессов (О.Л. Курбатова). Пленарные доклады в секции механизмов видообразования были посвящены вопросам сальтационного видообразования и системных мутаций (В.Н. Стегний), роли биокомпьютерных процессов с участием опухолей в качестве поисковых систем (А.П. Козлов), новому взгляду на биоразнообразие гольцов (А.Г. Олейник) и молекулярной эволюции, систематике и филогенетике водных организмов (Ю.Ф. Картавцев).

Устные доклады были сгруппированы по направлениям и представлены на двух параллельных заседаниях. На секции “Генетические процессы в популяциях животных” рассматривались следующие темы: сохранение редких видов животных в природе; изучение генофондов и генетическая идентификация ценных сельскохозяйствен-

ных и промысловых видов; филогения, филогеография, генетическое разнообразие и гибридизация природных популяций; изучение популяций животных в зонах радиоактивного загрязнения. На секции “Генетические процессы в популяциях растений” были представлены доклады по изучению и сохранению генофондов ценных лесобразующих и декоративных деревьев и кустарников; оценке генетического разнообразия сельскохозяйственных видов и сортов; изучению генетической адаптации растений в радиоактивно загрязненной и антропогенно нарушенной среде; филогении, генетическому разнообразию и гибридизации природных популяций растений; применению молекулярно-генетических подходов в лесосеменном районировании и идентификации происхождения древесины. Секция “Генетические процессы в популяциях человека” была посвящена популяционно-генетическим и генетико-демографическим исследованиям населения мегаполисов, коренных народов и родовых групп, а также изучению и диагностике генетических полиморфных вариантов, ассоциированных с болезнями человека. Секция “Механизмы видообразования” охватывала вопросы анализа происхождения и эволюции видов, моделирования видообразования, изучения хромосомного аппарата, мобильных элементов и мутаций разных организмов.

По материалам прошедшей конференции издан сборник тезисов “Генетические процессы в популяциях” [3]; также памяtnому событию посвящены тематические номера журналов “Генетика” (Т. 58, № 11, 2022 г.) и “Успехи современной биологии” (Т. 142, № 5, 2022 г.).

Конференция получила большой и позитивный отклик научной общественности. Участники единодушно выразили заинтересованность в продолжении “алтуховских” научных мероприятий, ставших уже традиционными. Следующая конференция, приуроченная к 90-летию юбилею академика Ю.П. Алтухова, предположительно состоится в ИОГен РАН в 2026 г.

Более подробно ознакомиться с содержанием и программой конференции “Генетические процессы в популяциях”, а также скачать сборник тезисов можно на сайте <https://confpopgen.confreg.org>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Проблемы популяционной и общей генетики. Популяционная генетика: современное состояние и перспективы. Материалы Международных конференций, посвященных памятной дате — 75-летию со дня рождения академика Ю.П. Алтухова (14–18 ноября 2011 г., Москва). М.: Цифровичок, 2011. 270 с.
2. Генетика популяций: прогресс и перспективы. Материалы Международной научной конференции, посвященной 80-летию со дня рождения академика Ю.П. Алтухова (1936–2006) и 45-летию основания лаборатории популяционной генетики им. Ю.П. Алтухова ИОГен РАН (17–21 апреля 2017 г., Звенигородская биологическая станция им. С.Н. Скадовского биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова). М.: Ваш Формат, 2017. 354 с.
3. Генетические процессы в популяциях. Материалы научной конференции с международным участием, посвященной 50-летию юбилею лаборатории популяционной генетики им. Ю.П. Алтухова ИОГен РАН и 85-летию со дня рождения академика Ю.П. Алтухова (11–14 октября 2022 г., Москва). М.: Ваш Формат, 2022. 150 с.