

ISSN 1999-9127

Государственное научное учреждение
**«ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И ЦИТОЛОГИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»**

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ
ТОМ 30**

Издается с 2005 года
Выходит два раза в год

Минск
2021

УДК [577.21+575] (082)

Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол.: А. В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. — Минск: Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 2021. — Т. 30. — 118 с. — ISSN 1999-9127.

В сборнике научных трудов публикуются обзорные и экспериментальные статьи в области молекулярной и прикладной генетики растений, микроорганизмов, животных, человека, отражающие исследования генетических процессов на молекулярном, клеточном, организменном и популяционном уровнях. Особое внимание уделяется наиболее актуальным проблемам геномики, генетической и клеточной инженерии. Публикуются результаты изучения генетических основ селекции растений, животных и микроорганизмов, разработки эффективных биотехнологий для сельского хозяйства, здравоохранения, охраны окружающей среды, биобезопасности.

Сборник предназначен для специалистов, работающих в области генетики, преподавателей, аспирантов и студентов ВУЗов биологического, сельскохозяйственного и медицинского профиля.

Редакционная коллегия:

А. В. Кильчевский — главный редактор, Л. В. Хотылёва — зам. главного редактора;
К. У. Вильчук, С. И. Гриб, О. Г. Давыденко, А. Н. Евтушенков, А. П. Ермишин,
А. И. Ковалевич, Ф. И. Привалов, А. В. Сукало, В. А. Лемеш, С. А. Лихачёв,
Н. П. Максимова, С. Б. Мельнов, М. Е. Михайлова, И. Б. Моссэ, М. Е. Никифоров,
В. Е. Падутов, В. Н. Решетников, Е. А. Сычёва, Н. И. Дубовец, В. В. Титок, И. П. Шейко,
О. Н. Харкевич — члены редколлегии;
А. Л. Богданова — ответственный секретарь.

УДК [577.21+575] (082)
ISSN 1999-9127

Институт генетики
и цитологии НАН Беларуси, 2021

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Е. А. Аксенова, А. В. Солнцева, А. С. Иванова, Н. В. Волкова, А. В. Сукало, О. Г. Давыденко</i> Некоторые аспекты генетической предрасположенности к развитию сочетанных аутоиммунных заболеваний у детей с сахарным диабетом 1 типа.....	5
<i>Р. И. Гончарова, Т. Д. Кужир, Е. С. Синявская</i> Ассоциация полиморфизма rs7574865 гена <i>STAT4</i> с риском развития и клиническими показателями ревматоидного артрита.....	14
<i>И. Ю. Бакутенко, И. Д. Гаврильчик, Е. В. Сечко, А. М. Чичко, А. В. Сукало, Н. И. Рябоконт</i> Роль полиморфизма гена <i>IRF5</i> в предрасположенности к ювенильной системной красной волчанке в белорусской популяции.....	25
<i>К. Ю. Песоцкая, А. Л. Лагоненко, А. Н. Евтушенко</i> Плейотропный эффект мутации в генах биосинтеза липополисахаридов фитопатогенных бактерий <i>Erwinia amylovora</i>	31
<i>В. Н. Кипень, М. В. Богданова, А. А. Буракова, О. И. Добыш, О. В. Зотова, Т. С. Королева, А. Г. Булгак, А. В. Байда, С. А. Брускин, В. А. Лемеш</i> Обоснование минимального объема выборки для предсказания хронологического возраста человека.....	39
<i>А. Н. Хархаль, Л. П. Титов</i> Сравнительная характеристика генетической структуры популяции менингококка в Республике Беларусь в довакцинальный период.....	49
<i>Е. Л. Романишко, М. Е. Михайлова, Р. И. Шейко</i> Выявление полиморфизмов 1843C>T в гене <i>RYR1</i> и 5860C>T в гене <i>DMD</i> , ассоциированных со стрессочувствительностью свиней, с использованием технологии KASP.....	61
<i>З. А. Козловская, Т. А. Гашенко, Ю. Г. Кондратенко, Т. Н. Марцинкевич</i> Полиморфизм популяции возбудителя парши яблони <i>Venturia inaequalis</i> в Беларуси.....	68
<i>С. С. Левыкина, Н. В. Воронова, Ю. В. Бондаренко</i> Структура митохондриального генома <i>Macrosiphum albifrons</i> Essig, 1911 — опасного вредителя люпина.....	77
<i>Р. С. Шулинский, Ю. В. Бонадаренко, Н. В. Воронова</i> Гены иммунной системы в геноме тли <i>Aphis craccivora</i> Koch, 1854.....	85
<i>Л. В. Можаровская</i> Сравнительный анализ экспрессионной активности генов проростков сосны обыкновенной в условиях холодового стресса.....	95
<i>И. С. Казловский, И. В. Бельская, А. Б. Булатовский, А. И. Зинченко</i> Использование системы бесклеточного синтеза белка для получения бактериальной дигуанилатциклазы и двух химерных белков.....	105

CONTENTS

<i>E. A. Akseyonova, A. V. Solntsava, A. S. Ivanova, N. V. Volkova, A. V. Sukalo, O. G. Davydenko</i> Certain aspects of genetic preposition to the development of combined autoimmune diseases in children with type 1 diabetes mellitus.....	5
<i>R. I. Goncharova, T. D. Kuzhir, E. S. Sinyavskaya</i> Association of <i>STAT4</i> rs7574865 polymorphism with the risk of rheumatoid arthritis development and its clinical characteristics.....	14
<i>I. Y. Bakutenko, I. D. Haurylchyk, E. V. Sechko, A. M. Tchitchko, A. V. Sukalo, N. I. Ryabokon</i> Role of <i>IRF5</i> gene polymorphism in predisposition to juvenile-onset systemic lupus erythematosus in the Belarusian population.....	25
<i>K. Yu. Pesotskaya, A. L. Lagonenko, A. N. Evtushenkov</i> Pleiotropic effect of mutation in the genes involved in the biosynthesis of lipopolysaccharides of <i>Erwinia amylovora</i> phytopathogenic bacteria.....	31
<i>V. N. Kipen, M. V. Bahdanava, A. A. Burakova, O. I. Dobysh, O. V. Zotova, T. S. Koroleva, A. G. Bulgak, A. V. Baida, S. A. Bruskin, V. A. Lemesh</i> Determination of minimum sample size for the prediction of human chronological age	39
<i>H. N. Kharkhal, L. P. Titov</i> Comparative characteristics of the genetic structure of the meningococcal population in the Republic of Belarus in the prevaccinal period.....	49
<i>E. L. Ramanishka, M. E. Mikhailova, R. I. Sheyko</i> Identification of polymorphisms 1843C>T in the <i>RYR1</i> gene and 5860C>T in the <i>DMD</i> gene associated with the stress sindrom of pigs using KASP technology	61
<i>Z. A. Kazlouskaya, T. A. Hashenka, J. G. Kandratsenak, T. M. Martsinkevich</i> Polymorphism of apple scab <i>Venturia inaequalis</i> in Belarus	68
<i>S. S. Levykina, N. V. Voronova, Y. V. Bandarenka</i> Mitochondrial genome structure of <i>Macrosiphum albifrons</i> Essig, 1911 — a dangerous pest of lupine.....	77
<i>R. S. Shulinsky, Y. V. Bandarenka, N. V. Voronova</i> Immune system genes in the <i>Aphis craccivora</i> Koch, 1854 genome.....	85
<i>L. V. Mozharovskaya</i> Comparative analysis of the expression activity of Scots pine seedling genes in cold stress conditions.....	95
<i>I. S. Kazlouski, I. V. Belskaya, A. B. Bulatovskiy, A. I. Zinchenko</i> The use of a cell-free protein synthesis for obtaining bacterial diguanylatcyclase and two chimeric proteins	105

Е. А. Аксенова¹, А. В. Солнцева³, А. С. Иванова¹, Н. В. Волкова², А. В. Сукало², О. Г. Давыденко¹

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К РАЗВИТИЮ СОЧЕТАННЫХ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У ДЕТЕЙ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1 ТИПА

¹Государственное научное учреждение

«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»

Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

e-mail: axenova_elen@mail.ru

²Учреждение образования

«Белорусский государственный медицинский университет»

Республика Беларусь, 220116, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83

³Государственное учреждение

«Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

Республика Беларусь, 223053, Минский р-н, д. Боровляны, ул. Фрунзенская, 43

Проведено генотипирование 64 детей основной группы с сочетанными с сахарным диабетом 1 типа (СД 1 типа) аутоиммунными заболеваниями (аутоиммунный тиреоидит (АИТ) и/или целиакия) и 135 пациентов детского возраста группы сравнения с изолированным заболеванием сахарным диабетом 1 типа по аллелям генов-предикторов, не относящихся к HLA: CT60 (+6230G>A) (rs3087243), с.49A>G (rs231775) гена цитотоксического антигена (рецептора) Т-лимфоцитов 4 (*CTLA4*), с.1858C>T(rs2476601) гена тирозиновой фосфатазы лимфоцитов (*PTPN22*), микросателлитного повтора в 5 экзоне гена неканонических молекул гистосовместимости класса I MICA. У пациентов с сочетанным с СД 1 типа АИТ установлена ассоциация с.49AA генотипа (rs231775) и А аллеля (rs3087243) по изученным локусам гена *CTLA4* с риском появления транзиторных антител к глиадину. Во всех группах пациентов преобладал 5.1 STR-аллель гена *MICA*, наличие гомозиготного генотипа A5.1/A5.1 гена *MICA* у пациентов с СД 1 типа увеличивает в 2 раза (OR = 2,13, 95% CI: 1,0003–4,5321, P = 0,0499) риск развития АИТ.

Ключевые слова: сахарный диабет 1 типа, аутоиммунный тиреоидит, целиакия, *CTLA4*, *PTPN22*, *MICA*.

Введение

Сахарный диабет 1 типа развивается при аутоиммунной деструкции β-клеток поджелудочной железы. СД 1 типа в детской популяции часто сочетается с другими аутоиммунными заболеваниями (аутоиммунный тиреоидит (АИТ), целиакия и др.). Это значительно ухудшает показатели долговременного метаболического контроля диабета в детском возрасте и увеличивает частоту тяжелых осложнений. СД 1 типа, АИТ и целиакия имеют аутоиммунное происхождение и связаны с нарушением регулирования селективного отсеивания аутореактивных клеток в процессе созревания Т-лимфоцитов в тимусе. Цитотоксический рецептор Т-лимфоцитов (*CTLA4*), задачей ко-

торого является селекция и апоптоз Т-клеток с высокой аутореактивностью [1], кодируется геном *CTLA4*, который локализован на второй хромосоме в локусе 2q33 между двумя генами активаторами Т-лимфоцитов: геном рецептора-активатора (*CD28*) и геном индуцируемого ко-стимулятора (*ICOS*) [2, 3]. Однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в положении +49 экзона 1 (с.49A>G; rs231775), который кодирует лидерный белок рецептора, приводит к аминокислотной замене треонина на аланин в 17 кодоне лидерного пептида. Это вызывает снижение функциональной активности белка *CTLA4* [4]. В ряде исследований было показано увеличение риска АИТ или болезни Грейвса при GG генотипе rs231775 гена *CTLA4* [15, 16].

СТ60 (rs3087243) однонуклеотидный полиморфизм в 3'-регионе гена *CTLA4* ассоциирован с заболеванием как СД 1 типа, так и АИТ, поскольку влияет на эффективность сплайсинга и, соответственно, длину мРНК [5].

Белок тирозиновой фосфатазы лимфоцитов (Lyp), взаимодействующей с сигнальной молекулой цитоплазматической c-Src тирозинкиназы (Csk), кодируется геном *PTPN22*, который локализован на первой хромосоме 1p13. Точечная однонуклеотидная замена цитозина на тимин в позиции 1858 (rs2476601) этого гена приводит к замене аргинина на триптофан (R620W) в SH3-связывающем сайте белка (одном из четырех). Такая мутация называется мутацией увеличения функции, поскольку вызывает повышение каталитической активности тирозиновой фосфатазы лимфоцитов и увеличение отрицательной регуляции активации Т-лимфоцитов [6].

Неканонические молекулы гистосовместимости класса I MICA (MHC class I-related molecules) представляют собой трансмембранный белок, включающий внутриклеточный домен, дистальные домены G-ALPHA1 [D1] и G-ALPHA2 [D2]-подобные и C-подобный [D3] проксимальный домен клеточной мембраны с высоким потенциалом гликозилирования [7]. Данный белок экспрессируется в кретиноцитах, эндотелиальных клетках и моноцитах в условиях стресса [8]. Белок MICA имеет длину от 360 до 366 п. н. в зависимости от количества микросателлитных повторов в кодирующей трансмембранный участок белка области. Микросателлитные повторы (Short Tandem Repeat «STR») находятся в экзоне 5 гена *MICA*. Триплетные GCT повторы кодируют полиаланиновую цепь (A, Ala) длиной от 4 до 10 аминокислот, а STR-аллели обозначают как A4, A5, A6, и пр. до A10 соответственно. Особо выделяют A5.1 аллель, в котором помимо пяти триплетных GCT повторов, кодирующих полиаланиновую цепь, обнаруживается вставка гуанина (G), приводящая к сдвигу рамки считывания, образованию стоп-кодона и терминации транскрипции [3, 9]. В ряде исследований показан различный эффект аллелей STR локуса с совокупности с генотипами по аллелям HLA класса II на риск развития аутоиммунных заболеваний [10, 11]. Lopez-Vazquez с соавторами показали, что аллель A5.1 гена MICA чаще все-

го отмечен у пациентов с атипической (субклинической или олигосимптоматической) формой целиакии [12].

За последние 5 лет в Беларуси отмечено значительное увеличение общего количества детей с СД 1 типа. Сочетание различных заболеваний аутоиммунной природы у членов одной семьи позволяет предположить наличие генетической предрасположенности и указывает на общие патогенетические механизмы развития данных аутоиммунных поражений в детском возрасте. Однако, к настоящему времени комплексные клинические и генетические исследования пациентов с СД 1 типа, имеющие сочетанные аутоиммунные заболевания, в Республике Беларусь не проводились. Задачей нашего исследования было выявление наличия генотипов риска развития сочетанной с СД 1 типа аутоиммунной патологии для возможного прогнозирования рисков ее развития и ранней профилактики сопутствующих осложнений.

Материалы и методы

Нами было проведено генотипирование 64 детей основной группы с сочетанными с СД 1 типа аутоиммунными заболеваниями (АИТ и/или целиакия) и 135 пациентов детского возраста группы сравнения с изолированным сахарным диабетом 1 типа. Проводили сравнение по следующим подгруппам основной группы:

– в первую основную подгруппу были включены пациенты с СД 1 типа, у которых была диагностирована целиакия, а также у двух детей из этой группы были обнаружены транзиторные антитела к тиреоидной пероксидазе (ТПО);

– во вторую основную подгруппу вошли дети, у которых СД 1 типа сочетался с АИТ либо с болезнью Грейвса. Здесь была выделена подгруппа с транзиторным повышением уровня антител к глиадину. Также у одной пациентки были диагностированы и целиакия, и АИТ.

Группа сравнения включала пациентов с СД 1 типа, у которых не было сопутствующей аутоиммунной патологии. В этой группе мы выделили три подгруппы пациентов:

1) у которых были обнаружены транзиторные антитела к ТПО;

2) у которых были обнаружены транзиторное повышение уровня антител к глиадину;

3) у которых было обнаружено сочетание антител к ТПО и глиадину.

Также эти три подгруппы были объединены в одну для сравнения с данными пациентов с СД 1 типа, у которых не было сопутствующей аутоиммунной патологии и транзиторных антител.

Материалом исследования являлась геномная ДНК, выделенная из сухих пятен крови, нанесенных на фильтровальную бумагу и высушенных при комнатной температуре.

Нами были сконструированы праймеры и пробы для определения однонуклеотидных полиморфизмов СТ60 (+6230G>A) (rs3087243), с.49A>G (rs231775) гена цитотоксического антигена (рецептора) Т-лимфоцитов 4 (*CTLA4*), +1858Т (rs2476601) гена тирозиновой фосфатазы лимфоцитов (*PTPN22*), которые представлены в таблицах 1, 2.

Для генотипирования однонуклеотидных полиморфизмов применена методика аллель-специфичной ПЦР с помощью линейных разрушаемых проб (TaqMan). По окончании ПЦР с помощью программного обеспечения для амплификатора в режиме реального времени проводили анализ результатов с помощью программы BioRad CFXManager™.

Для генотипирования микросателлитного повтора в 5 экзоне *MICA* гена были использованы праймеры, приведенные в статье Gupta с соавторами [11]. Последовательность праймеров следующая: *MICA* прямой F 5'-ССТТТТТТТCAGGGAAAGTGC-3' и обратный, с флуоресцентной меткой, R 5'HEX-ССТТАССАТСТССАГАААСТGC-3'. После проверки амплификации образцы анализировали на генетическом анализаторе ABI PRISM® Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems, США) и обрабатывали результаты в программе GeneMapper® Software Version 5.1.

Расчет отношения шансов (OR) проводили с помощью онлайн-калькулятора [13]. Сравнение эмпирических распределений частоты генотипов и аллелей проводилось с использованием программы Excel for Windows 2010 по методу Хи-квадрат по следующей формуле [14]:

$$\chi^2 = \frac{1}{n_1 n_2} \sum \frac{(f_1 n_2 - f_2 n_1)^2}{f_1 + f_2}$$

Таблица 1

Праймеры к соответствующим районам генома, подобранные для генотипирования

Локус	Последовательность праймеров	Размер фрагмента
СТ60 (+6230G>A) (rs3087243) <i>CTLA4</i>	F 5'-GGAAGGTATCCATCCTCTTTCCT-3' R 5'-ACCTGTGTAAACAGCATGCCA-3'	116 п. о.
с.49A>G (rs231775) <i>CTLA4</i>	F 5'-GATTTTCAGCGGCACAAGGCT-3' R 5'-TGCTCCAAAAGTCTCACTCACC-3'	117 п. о.
<i>PTPN22</i> с.1858C>T (rs2476601)	F 5'-TTGGATAGCAACTGCTCCAAGG-3', R 5'-ACTGAACTGTACTCACCAGCTTC-3'	107 п. о.

Таблица 2

Аллель-специфичные зонды к соответствующим районам генома, подобранные для TaqMan анализа

Локус	Последовательность олигонуклеотидных зондов 5'—3'
<i>CTLA4</i> СТ60(с.6230G>A) (rs3087243)	G: FAM-GGATATAACGTGGGTTAACA-BHQ-1, A: HEX-GGATATAACATGGGTTAACAC-BHQ-1
<i>CTLA4</i> с.49A>G (rs231775)	G: FAM-AACCTGGCTGCCAGGA-BHQ-1, A: HEX-AACCTGGCTACCAGGACC-BHQ-1
<i>PTPN22</i> с.1858C>T (rs2476601)	C: FAM-CACTTCCTGTACGGACAC-BHQ-1, T: HEX-CCACTTCCTGTATGGACAC-BHQ-1

Результаты и обсуждение

Результаты генотипирования по однонуклеотидным полиморфизмам с.49A>G (rs231775) и СТ60 (+6230G>A) (rs3087243) гена *CTLA4*, с.1858C>T (rs2476601) гена *PTPN22* представлены в таблицах 3–5. В группах 2 и 4 были учтены данные по генотипам единственной пациентки с сочетанными с СД 1 типа заболеваниями целиакией и АИТ.

Обнаружено статистически достоверное различие по частоте генотипов с.49A>G (rs231775) и СТ60 (+6230G>A) (rs3087243) гена *CTLA4* между пациентами с СД 1 типа и АИТ и подгруппой пациентов с СД 1 типа, у которых помимо АИТ наблюдалось транзиторное повышение уровня антител к глиадину (табл. 3, 4). Генотип АА по локусу с.49A>G (rs231775) гена *CTLA4* увеличивает шансы повышения транзиторных антител к глиадину у пациентов с СД 1 типа и АИТ в 7 раз (OR = 7,4 95% CI: 1,1602–47,1990,

P = 0,342). При сравнении частоты генотипов по локусу СТ60 (+6230G>A) (rs3087243) гена *CTLA4* показано, что наличие АG и АА генотипов (OR= 5,57 95% CI: 0,3108–99,8743; P = 0,2434), а также А аллеля увеличивает шансы обнаружения транзиторных антител к глиадину у пациентов с СД 1 типа и АИТ (OR = 9,00 95% CI: 1,3691–59,165; P = 0,0222).

Что касается однонуклеотидного полиморфизма с.1858C>T (rs2476601) гена *PTPN22* (табл. 5), то, несмотря на то, что в группе пациентов с сочетанными заболеваниями СД 1 типа и целиакией ТТ генотип, связанный с повышением каталитической активности тирозиновой фосфатазы лимфоцитов, выявлен не был, статистически достоверных различий между частотой генотипов и аллелей по всем изученным группам не обнаружено. По данным ряда исследователей отношение шансов (OR) влияния генотипов по rs2476601 локусу гена *PTPN22*

Таблица 3

Частота генотипов и аллелей по однонуклеотидному полиморфизму с.49A>G (rs231775) гена *CTLA4*

№	Исследованные подгруппы	n	Частота генотипов (в %)			Частота аллелей (в %)	
			GG	AG	AA	G	A
1	Все пациенты основной группы при сочетанном с СД1 типа аутоиммунном заболевании (АИТ и/или целиакия)	64	28,1	56,3	15,6	56,3	43,8
2	Все пациенты основной группы с целиакией	16	25,0	50,0	25,0	50,0	50,0
3	Основная группа с целиакией без транзиторных антител к ТПО	14	28,6	42,9	28,6	50,0	50,0
4	Все пациенты основной группы с АИТ	49	28,6	59,2	12,2	58,2	41,8
5	Пациенты основной группы с АИТ без транзиторных антител к глиадину	40	25,0*	67,5*	7,5*	58,8	41,3
6	Пациенты основной группы с АИТ и транзиторным антителами к глиадину	8	50,0*	12,5*	37,5*	56,3	43,8
7	Все пациенты группы сравнения при изолированном сахарном диабете 1 типа	135	24,4	52,6	23,0	50,7	49,3
8	Пациенты группы сравнения без транзиторных антител к ТПО и глиадину	78	23,1	52,6	24,4	49,4	50,6
9	Пациенты группы сравнения с транзиторными антителами к ТПО	41	29,3	53,7	17,1	56,1	43,9
10	Пациенты группы сравнения с транзиторными антителами к глиадину	12	25,0	50,0	25,0	50,0	50,0
11	Пациенты группы сравнения, у которых были выявлены и транзиторные антитела к ТПО и глиадину	4	0,0	50,0	50,0	25,0	75,0
12	Пациенты группы сравнения (ячейки 9–11)	57	26,3	52,6	21,1	53,6	48,2

Примечание. * — различия по частоте генотипов в группах 5 и 6 достоверно отличались; $\chi^2 = 9,68$ при $P < 0,01$

Таблица 4

Частота генотипов и аллелей по однонуклеотидному полиморфизму
СТ60 (+6230G>A) (rs3087243) гена *CTLA4*

№	Исследованные подгруппы	n	Частота генотипов (в %)			Частота аллелей (в %)	
			GG	AG	AA	G	A
1	Все пациенты основной группы при сочетанном с СД 1 типа аутоиммунном заболевании (АИТ и/или целиакия)	64	92,2	3,1	4,7	93,7	6,3
2	Все пациенты основной группы с целиакией	16	87,5	6,3	6,3	90,0	10,0
3	Основная группа с целиакией без транзиторных антител к ТПО	14	85,7	7,1	7,1	89,3	10,7
4	Все пациенты основной группы с АИТ	49	93,9	2,0	4,1	94,9	5,1
5	Пациенты основной группы с АИТ без транзиторных антител к глиадину	40	97,5	0,0	2,5	97,5	2,5
6	Пациенты основной группы с АИТ и транзиторным антителами к глиадину	8	75,0*	12,5*	12,5*	81,2**	18,8**
7	Все пациенты группы сравнения при изолированном сахарном диабете 1 типа	135	87,4	5,2	7,4	90,0	10,0
8	Пациенты группы сравнения без транзиторных антител к ТПО и глиадину	78	87,2	3,8	9,0	89,1	10,9
9	Пациенты группы сравнения с транзиторными антителами к ТПО	41	87,8	4,9	7,3	90,2	9,8
10	Пациенты группы сравнения с транзиторными антителами к глиадину	12	83,3	16,7	0,0	91,7	8,3
11	Пациенты группы сравнения, у которых были выявлены и транзиторные антитела к ТПО и глиадину	4	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0
12	Пациенты группы сравнения (ячейки 9–11)	57	87,7	7,0	5,3	92,9	8,9

Примечание. * — различия по частоте генотипов в группах 5 и 6 достоверно отличались; $\chi^2 = 6,96$ при $P < 0,05$. ** — различия по частоте аллелей в группах 5 и 6 достоверно отличались; $\chi^2 = 7,13$ при $P < 0,01$

и rs3087243 локусу гена *CTLA4* на сопутствующее развитие у пациентов с СД 1 типа целиакии или АИТ находится в пределах 1,5–2 [15, 16].

В таблице 6 представлены частоты аллелей по микросателлитным повторам (STR-локусу) в 5 экзоне гена *MICA*. Всего было выявлено шесть типов аллелей в исследуемых группах: А4 (179 п. о.), А5 (182 п. о.), А5.1 (183 п. о.), А6 (185 п. о.), А8 (191 п. о.) и А9 (194 п. о.).

А5.1 аллель, в котором помимо пяти триплетных GCT повторов, кодирующих полиаланиновую цепь, обнаруживается вставка гуанина (G), приводящая к сдвигу рамки считывания, образованию стоп-кодона и терминации транскрипции [7, 9], встречался чаще всего в обеих выборках. Распределение частот аллелей было статистически недостоверно (табл. 6).

Генотипы по STR локусу гена *MICA* распределились согласно выявленной частоте

аллелей (рис.). Наиболее частым был гомозиготный генотип А5.1/А5.1 — частота во всех группах варьировала от 30,6% при сочетанной с АИТ патологией до 17,2% в группе сравнения с изолированным СД 1 типа. Также с высокой частотой встречался генотип А5.1/А9. В группе сравнения с изолированным СД 1 типа данных генотип был у 18,7% и в основной группе с сочетанными заболеваниями у 23,4% (рис.). Показано достоверное различие по частоте генотипов по STR локусу гена *MICA* между пациентами с сочетанным с СД 1 типа АИТ и выборки с изолированным СД 1 типа и транзиторными антителами к ТПО ($\chi^2 = 25,73$ при $P < 0,05$). Для пациентов с СД 1 типа риск развития АИТ увеличивается в 2 раза (OR = 2,13, 95% CI: 1,0003–4,5321, $P = 0,0499$) при гомозиготном генотипе А5.1/А5.1 гена *MICA*.

Таблица 5

Частота генотипов и аллелей по однонуклеотидному полиморфизму с.1858С>Т (rs2476601) гена *PTPN22*

№	Исследованные подгруппы	п	Частота генотипов (в %)			Частота аллелей (в %)	
			СС	СТ	ТТ	С	Т
1	Все пациенты основной группы при сочетанном с СД 1 типа аутоиммунном заболевании (АИТ и/или целиакия)	64	59,4	37,5	3,1	78,1	21,9
2	Все пациенты основной группы с целиакией	16	56,2	43,8	0,0	78,1	21,9
3	Основная группа с целиакией без транзиторных антител к ТПО	14	57,1	42,9	0,0	78,6	21,4
4	Все пациенты основной группы с АИТ	49	59,2	36,7	4,1	77,6	22,4
5	Пациенты основной группы с АИТ без транзиторных антител к глиадину	40	55,0	40,0	5,0	75,0	25,0
6	Пациенты основной группы с АИТ и транзиторным антителами к глиадину	8	87,5	12,5	0,0	93,8	6,3
7	Все пациенты группы сравнения при изолированном сахарном диабете 1 типа	135	67,4	27,4	5,2	81,1	18,9
8	Пациенты группы сравнения без транзиторных антител к ТПО и глиадину	78	71,8	21,8	6,4	82,7	17,3
9	Пациенты группы сравнения с транзиторными антителами к ТПО	41	61,0	34,1	4,9	78,0	22,0
10	Пациенты группы сравнения с транзиторными антителами к глиадину	12	66,7	33,3	0,0	83,3	16,7
11	Пациенты группы сравнения, у которых были выявлены и транзиторные антитела к ТПО и глиадину	4	50,0	50,0	0,0	75,0	25,0
12	Пациенты группы сравнения (ячейки 9–11)	57	61,4	35,1	3,5	80,4	21,4

Таблица 6

Частота (в %) аллелей по микросателлитным повторам (STR-локусу) в 5 экзоне гена *MICA*

№	Исследованные подгруппы	п	A4 (179)	A5 (182)	A5.1 (183)	A6 (185)	A8 (191)	A9 (194)
1	Все пациенты основной группы при сочетанном с СД 1 типа аутоиммунном заболевании (АИТ и/или целиакия)	64	9,38	7,81	46,88	10,16	0,00	25,78
2	Все пациенты основной группы с целиакией	16	6,25	12,50	46,88	9,38	0,00	25,00
3	Основная группа с целиакией без транзиторных антител к ТПО	14	3,57	14,29	46,43	10,71	0,00	25,00
4	Все пациенты основной группы с АИТ	49	10,20	6,12	46,94	10,20	0,00	26,53
5	Пациенты основной группы с АИТ без транзиторных антител к глиадину	40	10,00	3,75	45,00	12,50	0,00	28,75
6	Пациенты основной группы с АИТ и транзиторным антителами к глиадину	8	12,50	18,75	56,25	0,00	0,00	12,50
7	Все пациенты группы сравнения при изолированном сахарном диабете 1 типа	135	13,43	10,45	42,16	14,93	0,37	18,66
8	Пациенты группы сравнения без транзиторных ат к ТПО и глиадину	78	12,2	11,5	47,4	12,8	0,0	16,0

Продолжение таблицы 6

№	Исследованные подгруппы	n	A4 (179)	A5 (182)	A5.1 (183)	A6 (185)	A8 (191)	A9 (194)
9	Пациенты группы сравнения с транзиторными антителами к ТПО	41	14,6	8,5	35,4	22,0	1,2	18,3
10	Пациенты группы сравнения с транзиторными антителами к глиадину	12	4,9	3,7	7,3	0,0	0,0	11,0
11	Пациенты группы сравнения, у которых были выявлены и транзиторные ат к ТПО и глиадину	4	12,5	0,0	50,0	25,0	0,0	12,5
12	Пациенты группы сравнения (ячейки 9–11)	57	15,2	8,9	34,8	17,9	0,9	22,3

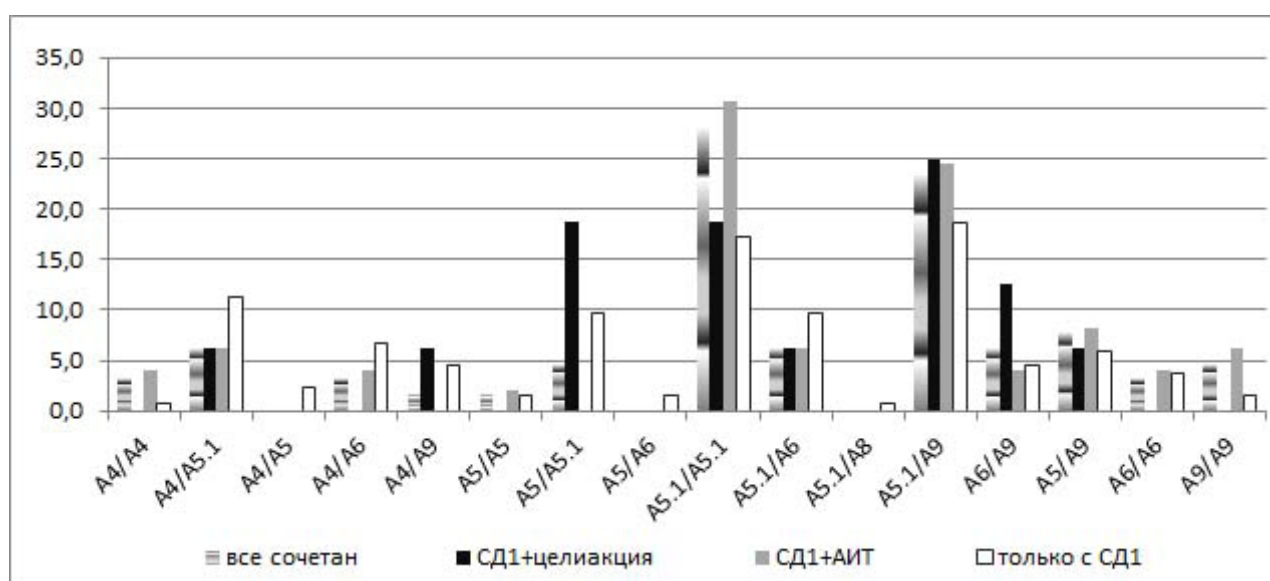


Рис. Частота (в %) генотипов по STR локусу гена MICA в изучаемых группах пациентов: сравнения — при изолированном заболевании сахарным диабетом 1 типа и основная группа — при сочетанном с СД 1 типа аутоиммунном заболевании (АИТ и/или целиакия)

Заключение

Нами было проведено сравнительное исследование генотипов по аллелям генов-предикторов, не относящихся к HLA: CT60 (+6230G>A) (rs3087243), с.49AG (rs231775) гена цитотоксического антигена (рецептора) Т-лимфоцитов 4 (CTLA4), с.1858T (rs2476601) гена тирозиновой фосфатазы лимфоцитов (PTPN22), микросателлитного повтора в 5 экзонегена неканонических молекул гистосовместимости класса I MICA в группах пациентов детского возраста с сочетанными с сахарным диабетом 1 типа аутоиммунными заболеваниями — целиакией и аутоиммунным тиреоидитом, а также в группе сравнения с изолированным СД 1 типа, которые включали подгруппы детей с транзиторным повышением уровня ан-

тител к тиреоидной пероксидазе и/или глиадину. По с.49A>G; (rs231775) локусу гена CTLA4, связанного с функциональной активностью рецептора, была получена примерно одинаковая частота встречаемости аллелей и генотипов, что можно объяснить общей природой аутоиммунных механизмов при данных заболеваниях. Была выявлена ассоциация генотипа AA по локусу с.49A>G (rs231775) гена CTLA4 и A аллеля по локусу CT60 (+6230G>A) (rs3087243) гена CTLA4 у пациентов с СД 1 типа и АИТ с обнаружением транзиторных антител к глиадину. Различия по частоте генотипов с.49A>G (rs231775) и CT60 (+6230G>A) (rs3087243) гена CTLA4 в данных группах были статистически достоверные. В группах пациентов с целиакией не обнаружен генотип TT по локусу

с.1858C>T (rs2476601) гена *PTPN22*, связанный с повышением каталитической активности тирозиновой фосфатазы лимфоцитов. Однако статистически достоверных различий по распределению частот генотипов и аллелей по данному локусу обнаружено не было. По STR локусу гена *MICA* отмечено преобладание у изученных пациентов аллеля 5.1 и гомозиготного генотипа 5.1/5.1, ассоциированных с риском развития аутоиммунных заболеваний в целом и атипичной целиакии в частности. Показано достоверное различие по частоте генотипов по STR локусу гена *MICA* между пациентами с сочетанным с СД 1 типа АИТ и выборки с изолированным СД1 типа и транзиторными антителами к ТПО ($\chi^2 = 25,73$ при $P < 0,05$). Наличие гомозиготного генотипа А5.1/А5.1 гена *MICA* у пациентов с СД 1 типа увеличивает в 2 раза (OR = 2,13, 95% CI: 1,0003–4,5321, $P = 0,0499$) риск развития АИТ.

Полученные результаты будут использованы при разработке инструкции на метод комплексного прогнозирования рисков развития сочетанной аутоиммунной патологии у детей с сахарным диабетом 1 типа.

Работы выполнены по договору № 2018-28-006 от 23.03.2018 на выполнение НИОК(Т)Р вне рамок государственных программ, государственных (отраслевых) научно-технических программ за счет средств республиканского централизованного инновационного фонда.

Список использованных источников

- Kristiansen, O. P. CTLA-4 in autoimmune diseases - a general susceptibility gene to autoimmunity? / O. P. Kristiansen, Z. M. Larsenand, F. Pociot // *Genes and Immunity*. – 2000. – Vol. 1. – P. 170–184.
- Coyle, A. J. The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses / A. J. Coyle [et al.] // *Immunity*. – 2000. – Vol. 13. – P. 95–105.
- Kim, M. S. Immunogenetics of type 1 diabetes / M. S. Kim, C. Polychronakos // *Hormone Research*. – 2005. – Vol. 64. – P. 180–188.
- Kouki, T. CTLA-4 gene polymorphism at position 49 of exon 1 reduces the inhibitory function of CTLA-4 and contributes to the pathogenesis of Graves' disease / T. Kouki [et al.] // *J. Immunology* – 2000. – Vol. 165. – P. 6606–6611.
- Ueda, H. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease / H. Ueda [et al.] // *Nature*. – 2003. – Vol. 423. – P. 506–511.
- Vang, T. Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant / T. Vang [et al.] // *Nature Genetics*. – 2005. – Vol. 37. – P. 1317–1319.
- Frigoul, A. MICA: Standardized IMGT allele nomenclature, polymorphisms and diseases / A. Frigoul, M-P. Lefranc // *Recent Res. Devel. Human Genet*. – 2005. - Vol. 3. – P. 95–145
- Zwirner, N. W. MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells, and monocytes / N. W. Zwirner, M. A. Fernandez-Vina, P. Stastny // *Immunogenetics*. – 1998. – Vol. 47. – P. 139–148.
- Mizuki, N. Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: a strong association of six GCT repetitions with Behçet disease / N. Mizuki [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1997. – Vol. 94, № 4. – P. 1298–1303.
- Fojtíková, M. HLA classII, MICA and PRL gene polymorphisms: the common contribution to the systemic lupus erythematosus development in Czech population / M. Fojtíková [et al.] // *Rheumatology International, Springer Verlag*. – 2010. – Vol. 31, № 9. – P. 1195–1201.
- Gupta, M. Association Between the Transmembrane Region Polymorphism of MHC Class I Chain Related Gene-A and Type 1 Diabetes Mellitus in Sweden / M. Gupta [et al.] // *Human Immunology*. – 2003. – Vol. 64. – P.553–561.
- Lopez-Vazquez, A. MHC class I chain related gene A (MICA) modulates the development of celiac disease in patients with the high risk heterodimer DQA1*0501/DQB1*0201 / A. Lopez-Vazquez [et al.] // *Gut*. – 2002. – Vol. 50. – P. 336–340.
- Odds ratio calculator [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php. – Дата доступа: 01.11.2020.
- Рокицкий, П. Ф. Биологическая статистика. – Минск: Высшая школа, 1964. – С. 273.
- Gutierrez-Achury, J. Contrasting the Genetic Background of Type 1 Diabetes and Celiac Disease Autoimmunity / J. Gutierrez-Achury [et al.] // *Diabetes Care*. – 2015. – Vol. 38, Suppl. 2. – S37–S44.
- Pearce, S. H. S. Genetics of Type 1 Diabetes and Autoimmune Thyroid Disease / S. H. S. Pearce, T. R. Merriman // *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. – 2009. – Vol. 38. – P. 289–301.

E. A. Aksyonova¹, A. V. Solntsava³, A. S. Ivanova¹, N. V. Volkova², A. V. Sukalo², O. G. Davydenko¹

CERTAIN ASPECTS OF GENETIC PREPOSITION TO THE DEVELOPMENT OF COMBINED AUTOIMMUNE DISEASES IN CHILDREN WITH TYPE 1 DIABETES MELLITUS

¹State Scientific Institution

“Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus”

27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, Republic of Belarus

e-mail: axenova_elen@mail.ru

²Belarusian State Medical University

83 Dzerzhinski Ave., 220116 Minsk, Belarus

³Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology

43 Frunzenskaya St., 223053 Borovlyany village, Minsk Region, Belarus

Genotyping of 64 children of the main group with combined with type 1 diabetes mellitus (type 1 diabetes) autoimmune diseases (autoimmune thyroiditis (AIT) and/or celiac disease) and 135 pediatric patients of the comparison group with isolated type 1 diabetes mellitus was performed by predictor gene alleles not related to HLA: CT60 (+6230G>A) (rs3087243), c.49A>G (rs231775) of the cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (*CTLA4*) gene, c.1858C>T (rs2476601) of the tyrosine phosphatase lymphocyte (*PTPN22*) gene, a microsatellite repeat in exon 5 of the gene of non-canonical histocompatibility class I MICA molecules. In patients with combined AIT type 1 diabetes mellitus, an association was established between the c.49AA genotype (rs231775) and the A allele at the CT60 (+6230G>A) (rs3087243) loci of the *CTLA4* gene with the risk of transient antibodies to gliadin. In all groups of patients, the *MICA* 5.1 STR allele prevailed. The presence of the *MICA* A5.1/ A5.1 homozygous genotype in patients with type 1 diabetes doubles (OR = 2.13, 95% CI: 1.0003-4.5321, P = 0.0499) the risk of AIT development.

Keywords: type 1 diabetes mellitus, autoimmune thyroiditis, celiac disease, *CTLA4*, *PTPN22*, *MICA*.

Дата поступления статьи: 22 февраля 2021 г.

Р. И. Гончарова, Т. Д. Кужир, Е. С. Синявская

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА RS7574865 ГЕНА *STAT4* С РИСКОМ РАЗВИТИЯ И КЛИНИЧЕСКИМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА

Государственное научное учреждение
«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27
e-mail: r.goncharova@igc.by

На когорте из 287 пациентов с ревматоидным артритом (РА) показано, что молекулярные варианты (минорный аллель Т и гомозиготный ТТ генотип) полиморфного локуса rs7574865 гена *STAT4* повышают риск развития РА и оказывают влияние на клинические показатели патологического процесса. В частности, они ассоциированы с высокой активностью заболевания ($p = 0,0023$) и III-IV рентгенологической стадией болезни, а также с функциональной недостаточностью 2-ой степени у пациентов с РА при продолжительности заболевания более 5 лет. Выявленная сопряженность молекулярных вариантов изученного локуса rs7574865 гена *STAT4* с клиническими показателями заболевания свидетельствует о том, что полиморфизм rs7574865 гена *STAT4* является эффективным маркером повышенного риска возникновения РА у населения Республики Беларусь.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, генетический полиморфизм, rs7574865, *STAT4*, степень активности заболевания, рентгенологическая стадия заболевания, степень функциональной недостаточности, функциональный класс.

Введение

Ревматоидный артрит (РА) является социально значимым заболеванием, регистрируемым у 1–1,5% взрослого населения Европы и Северной Америки [1]. Это заболевание относится к аутоиммунной патологии соединительной ткани, поражающей прежде всего суставы, а также характеризующейся широким спектром внесистемных (внесуставных) проявлений. Оно приводит к серьезным последствиям для здоровья пациентов, сопровождается значительным ухудшением качества жизни и утратой трудоспособности. Болезнь грозит потерей двигательных функций, вызванной разрушением кости, хряща и анкилозом суставов; обуславливает большие затраты на лечение, включающее пожизненную лекарственную терапию и в некоторых случаях дорогостоящие операции по замене суставов, реабилитацию и пенсионное обеспечение по инвалидности, что в конце концов наносит экономический ущерб всему обществу. Вторая проблема — эффективность лечения РА, которая напрямую зависит от того, насколько

своевременно и правильно поставлен диагноз. В то же время имеющиеся клиничко-лабораторные методы диагностики недостаточно специфичны и информативны для раннего выявления этой патологии; они не позволяют зарегистрировать изменения, происходящие в организме на досимптоматических стадиях болезни [2]. Поэтому необходимо развить новые подходы к решению этих проблем, основанные на современных знаниях о генетической основе заболевания.

РА входит в группу многофакторных заболеваний, возникающих на фоне генетической предрасположенности под влиянием факторов внешней среды. В настоящее время известно более 200 генов предрасположенности к РА у взрослого населения [3–5], свидетельствующих о полигенном характере заболевания с небольшим вкладом (1–5%) отдельных генетических вариантов в риск его возникновения [6]. При изучении влияния ряда генетических вариантов на восприимчивость различных популяций к РА обнаружена этническая специфичность наблюдае-

клинико-рентгенологической классификации О. Steinbrocker et al. [14, 15]. В исследовании использовано понятие «степень функциональной недостаточности» опорно-двигательного аппарата с констатацией 4 степеней нарушений (ФН₀₋₃), что равносильно градациям функциональной способности пациента в виде 4 классов (ФК₁₋₄), предложенных О. Steinbrocker et al., и модифицированных М.С. Hochberg et al. [14,16]. Клинические показатели РА, в частности, СА, СТ и ФН, пациентов с РА, для которых было проведено генотипирование, представлены в таблице 2.

Как следует из таблицы 2, большинство пациентов с РА имели среднюю активность вос-

палительного процесса, II, III или IV рентгенологическую стадию РА (23,34%, 20,56% и 27,53% соответственно) и 2 степень функциональной недостаточности.

Сбор биологического материала (периферической венозной крови) проводился сотрудниками медицинского учреждения после получения письменного информированного согласия. Данные о степени активности заболевания, рентгенологической стадии болезни и степени функциональных нарушений вместе с образцами периферической венозной крови передавались в Институт генетики и цитологии НАН Беларуси в рамках выполнения совместного со 2-ой кафедрой внутрен-

Таблица 2

Некоторые клинические показатели в когорте пациентов с установленным диагнозом РА

Характеристики	Показатели
Средняя продолжительность болезни (минимальная, максимальная)	12,03±10,10 лет (0,15 месяца, 54,87 лет)
Степень активности процесса, (%):	
0	0 (0,00)
1	17 (5,92)
1–2	1 (0,35)
2	178 (62,02)
3	39 (13,59)
Нет данных	52 (18,12)
Стадия заболевания, (%):	
I	8 (2,79)
II	67 (23,34)
II–III	9 (3,13)
III	59 (20,56)
III–IV	11 (3,83)
IV	79 (27,53)
Нет данных	54 (18,82)
Функциональная недостаточность, степень (%):	
0	0 (0,00)
1	40 (13,94)
1–2	2 (0,70)
2	155 (54,00)
2–3	18 (6,27)
3	20 (6,97)
Нет данных	52 (18,12)

них болезней Белорусского государственного медицинского университета задания 6.4 «Молекулярно-генетическая оценка риска аутоиммунных заболеваний» научно-технической программы Союзного государства «ДНК-идентификация».

Тотальная геномная ДНК выделялась из образцов крови методом фенол-хлороформной экстракции. Определение аллельного статуса по полиморфному локусу rs7574865 гена *STAT4* осуществляли методом ПЦР в реальном времени с флуоресцентно мечеными зондами. Реакция проводилась в объеме 10 мкл и содержала 100 нг геномной ДНК, 1 × смесь для ПЦР с термостабильной ДНК-полимеразой с «горячим стартом» (Праймтех, АртБиоТех, Республика Беларусь), прямой и обратный праймеры (Праймтех) и каждый из специфических зондов (Праймтех) (табл. 3).

После начальной денатурации в течение 10 мин при 95 °С проводили 40 циклов амплификации: денатурация при 95 °С — 15 с, отжиг при 56 °С — 30 с и элонгация с детекцией флуоресценции на каждом цикле при 72 °С — 30 с в термоциклере CFX96 (Bio-Rad). Для оценки результатов и присвоения генотипов использовали программное обеспечение Bio-Rad CFX Maestro 1.0. Статистическую обработку данных проводили с использованием программ Statistica 7.0 (StatSoftInc.) и MS Excel (Microsoft Corporation). Статистическую значимость различий в распределении частот аллелей/генотипов в исследуемых выборках оценивали с помощью критерия χ^2 или точного критерия Фишера, различия по количественным признакам при нормальном распределении определяли по критерию t-Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Таблица 3

Параметры использованных праймеров и зондов для генотипирования методом ПЦР в реальном времени по локусу rs7574865 гена *STAT4*

Полиморфизм	Праймеры, зонды	Ампликон (п. о.)
<i>STAT4</i> G>T rs7574865	Прямой праймер 5' – GCAAATCTTTGTAAAAAGTCAA – 3' Обратный праймер 5' – TTATGGAAAATTCATGAGTGTG – 3' Зонд к G аллелю FAM – 5' – CACTATTCACATTTTGGTCAC – 3' – BHQ-1 Зонд к T аллелю ROX – 5' – CACTATTAACATTTTGGTCAC – 3' – BHQ-2	156

Результаты и обсуждение

По результатам генотипирования локуса rs7574865 гена *STAT4* (табл. 4) в контрольной когорте частота минорного аллеля составила 3,47%, гомозиготного генотипа по минорному аллелю — 22,54%, что соответствует частотам, зарегистрированным для других европейских популяций [17].

Для когорты пациентов с РА были обнаружены статистически значимые различия в распределении генотипов (по рецессивной модели наследования, TT vs GG+GT; $p = 0,0094$; OR = 2,53; 95 % CI [1,246–5,174]) и в распределении аллелей ($p = 0,0346$; OR = 1,31; 95% CI [1,019–1,699]) по сравнению с контрольной когортой.

Поскольку РА характеризуется вариабельностью клинических проявлений и патогенетических механизмов у индивидов с одним и тем же официальным диагнозом или на различных стадиях заболевания, предпринята попытка проанализировать распределение генотипов/аллелей по локусу *STAT4* rs7574865 в зависимости от клинических показателей заболевания (табл. 2) и продолжительности болезни. Следует отметить, что когорта РА, для которой был проведен молекулярно-генетический анализ в нашем исследовании, является гетерогенной по продолжительности болезни, от которой в какой-то мере зависят такие показатели, как СТ и ФН. Напротив, СА может быть низкой или высокой при любой продолжительности болезни (рис.).

Так, видно, что между показателями активности процесса нет различий в группах пациентов с разной продолжительностью болезни, тогда как стадия заболевания статистически значимо изменяется: частота СТИ прямолинейно уменьшается с 57% при продолжительности болезни менее 5 лет до 11% при продолжительности более 10 лет, а частота СТИV увеличивается от 9% до 59% в этих же группах ($p < 0,00001$ в обоих случаях). Наблюдалась также противоположная динамика показателей ФН1 и ФН3 ($p = 0,0004$ и $< 0,00001$ соответственно), но частота ФН2 в процентном отношении колебалась в небольших пределах — от 70 до 64%. Результаты этого анализа позволили оценить ассоциацию полиморфного локуса *STAT4* rs7574865 со степе-

пенью активности (СА) для полной когорты пациентов (табл. 5).

Из данных, представленных в таблице, следует, что «минорный» генотип (ТТ) по локусу *STAT4* rs7574865 встречается с большей частотой в полной когорте пациентов с РА, чем в контрольной когорте ($p = 0,018$; OR = 2,44; 95% CI [1,17–5,15]). Несмотря на то, что частота этого генотипа статистически значимо не различается между группами СА1, СА2 и СА3, в последней группе она значительно выше, чем в контроле ($p = 0,0023$; OR = 5,05; 95% CI [1,78–14,36]). Следовательно, можно констатировать, что полиморфизм в изученном локусе *STAT4* влияет на чувствительность индивидов к РА и способствует высокой активности процесса.

Таблица 4

Распределение частот генотипов и аллелей полиморфного локуса rs7574865 гена *STAT4* в когорте пациентов с РА по сравнению с контрольной когортой

Генотипы/аллели	Контроль		РА	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
<i>STAT4</i> rs7574865	346	—	287	—
GG	202	58,38	152	52,96
GT	132	38,15	111	38,68
TT	12	3,47	24	8,36¹
G	536	77,46	415	72,30
T	156	22,54	159	27,70²

Примечание. Полу жирным начертанием отмечены статистически значимые различия ($p < 0,05$) с контролем. ¹ — РА по сравнению с контролем рецессивная модель TT vs. GG+GT, $p = 0,0094$ OR 2,53 [1,246 – 5,174]; ² — по сравнению с контролем $p = 0,0346$ OR 1,31 [1,019 – 1,699].

Таблица 5

Частоты генотипов/аллелей в локусе *STAT4* rs7574865 во всей когорте пациентов РА с указанной степенью активности заболевания по сравнению с контрольной когортой

Ген, группа	Генотипы (%)			Минорный аллель (%)	p_1	p_2
	GG	GT	TT			
<i>STAT4</i> rs7574865				T		
Контроль	202 (58,4)	132 (38,2)	12 (3,5)	156 (22,5)	—	—
РА	130 (55,3)	86 (36,6)	19 (8,1)	124 (26,4)	ТТ: 0,015	—
СА1	13 (72,2)	4 (22,2)	1 (5,6)	6 (16,7)	—	ТТ: 0,18
СА2	98 (55,1)	68 (38,2)	12 (6,7)	92 (25,8)	—	
СА3	19 (48,7)	14 (35,9)	6 (15,4)	26 (33,3)	ТТ: 0,0008	

Примечание. Полу жирным начертанием отмечены статистически значимые различия ($p < 0,05$). p_1 — СА vs контроль; p_2 — СА vs СА

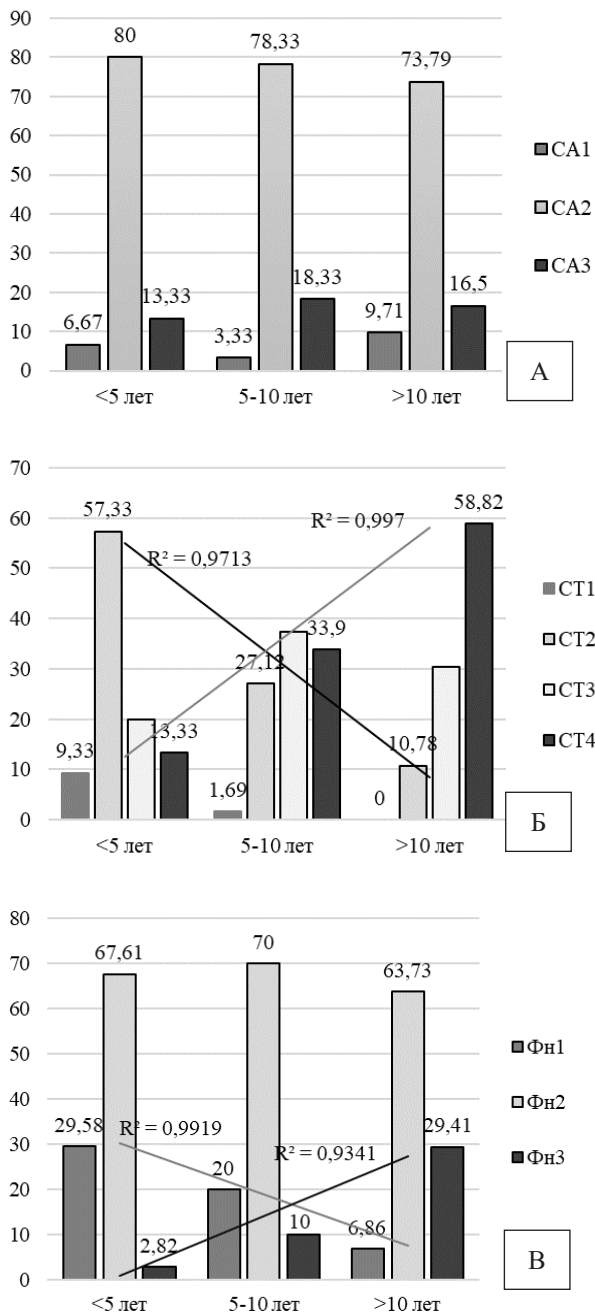


Рис. Частота (%) показателей СА (а), СТ (б) и ФН (в) в зависимости от продолжительности болезни

Данные по ассоциации аллелей/генотипов локуса *STAT4* rs7574865 со стадией заболевания для общей когорты пациентов (гетерогенной по продолжительности болезни) представлены в таблице 6.

Результаты проведенного анализа указывают на ассоциацию аллеля Т в локусе *STAT4* rs7574865 со стадией (СТIII) болезни ($p = 0,05$; $OR = 1,54$; $95\% CI [1,0-2,36]$), а поскольку ча-

стота этого аллеля такая же, как и в группе СТIV, можно считать, что носительство аллеля Т способствует более тяжелому течению РА.

Как показано выше (рис.), рентгенологическая стадия РА зависит от продолжительности болезни. Чтобы проверить наличие возможной связи аллелей/генотипов изученного локуса с вероятностью развития разных стадий болезни в зависимости от продолжительности болезни когорты пациентов была разделена на две группы (с продолжительностью болезни менее 5 лет, с продолжительностью болезни более 5 лет). При рассмотрении изучаемых ассоциаций в группах пациентов, страдающих РА (с продолжительностью болезни как менее, так и более 5 лет) (табл. 7) наблюдалось статистически значимое увеличение частоты гетерозиготного генотипа GT по локусу *STAT4* rs7574865 при тяжелом течении РА по сравнению с более легким ($OR = 2,83$, $95\% CI [1,09-7,31]$, $p = 0,032$ и $OR = 3,12$, $95\% CI [1,28-7,60]$, $p = 0,012$), что может отражать вклад этого генотипа в развитие болезни по более тяжелому сценарию.

Отмечено также сильное возрастание частоты генотипа TT ($p = 0,0017$; $OR = 28,08$; $95\% CI [3,48-226,69]$) и аллеля Т ($p < 0,0001$; $OR = 4,86$; $95\% CI [2,39-9,87]$) в группе с более легким течением РА при продолжительности болезни свыше 5 лет по сравнению с той же стадией у пациентов, страдающих РА менее 5 лет. Таким образом, можно полагать, что носительство генотипа GT по локусу *STAT4* rs7574865 является предиктором более тяжелого клинического течения заболевания, независимо от продолжительности болезни.

В таблице 8 приведены результаты анализа ассоциации вариантов *STAT4* rs7574865 у пациентов с разной степенью ФН.

Как следует из таблицы, в полной когорте пациентов, в развернутом диагнозе которых указана степень функциональной недостаточности, только минорный генотип в локусе *STAT4* rs7574865 (TT) ассоциирован с заболеванием ($p = 0,025$; $OR = 2,31$; $95\% CI [1,09-4,89]$). Анализ же ассоциаций генетических вариантов *STAT4* rs7574865 со степенью функциональной недостаточности при РА (табл. 9) в зависимости от продолжительности болезни показал фактическое отсутствие степени ФН3 в группе с продолжительностью болезни менее 5 лет, поэтому она была исключена из статистического анализа.

Таблица 6

Частоты генотипов/аллелей в локусе *STAT4* rs7574865 в когорте пациентов с РА с указанной стадией заболевания по сравнению с контрольной когортой

Ген, группа	Генотипы (%)			Минорный аллель (%)	p_1	p_2
	GG	GT	TT			
<i>STAT4</i> rs7574865				T		
Контроль	202 (58,4)	132 (38,2)	12 (3,5)	156 (22,5)	–	–
РА	90 (55,9)	60 (37,3)	11 (6,8)	82 (25,5)	TT: 0,09	–
СТ I-II	30 (69,8)	12 (27,9)	1, (2,3)	14 (16,3)	–	TT: 0,30 T: 0,081
СТ III	29 (49,2)	24 (40,7)	6 (10,2)	36 (30,5)	T: 0,049	
СТ IV	31 (52,5)	24 (35,9)	4 (6,8)	32 (27,1)	T: 0,067	

Примечание. Полу жирным начертанием отмечены статистически значимые различия ($p < 0,05$) с контролем. p_1 — СТ vs контроль; p_2 — СТ vs СТ

Таблица 7

Ассоциации генотипов/аллелей по локусу *STAT4* rs7574865 с рентгенологической стадией заболевания в группах пациентов с разной продолжительностью болезни

Лет	Ген, группа СТ	Генотипы (%)			Минорный аллель (%)	p
		GG	GT	TT		
	<i>STAT4</i> rs7574865				T	
<5	СТ I-II	41 (74,5)	13 (23,3)	1 (1,8)	15 (13,6)	–
	СТ III-IV	15 (50)	14 (46,7)¹	1 (3,3)	16 (26,7)	¹0,029
>5	СТ I-II	18 (47,4)	7 (18,4)	13 (34,2)³	33 (43,4)⁴	³0,00002; ⁴<0,00001
	СТ III-IV	66 (49,6)	55 (41,4)²	12 (9,0)	79 (29,7)	²0,0095

Примечание. Полу жирным начертанием отмечены статистически значимые различия ($p < 0,05$). ¹ — СТ I-II vs СТ III-IV в группах <5 лет; ² — то же в группах >5 лет; ³ — сравнение частот TT генотипа между группами по СТ СТ I-II с продолжительностью болезни <5 лет и >5 лет; ⁴ — сравнение частот T аллеля между группами по СТ СТ I-II с продолжительностью болезни >5 лет по СТ СТ I-II

Таблица 8

Частоты генотипов/аллелей в локусах *STAT4* rs7574865 в когорте пациентов с указанной степенью функциональной недостаточности по сравнению с контролем

Ген, группа	Генотипы (%)			Минорный аллель (%)	p_1	p_2
	GG	GT	TT			
<i>STAT4</i> rs7574865				T		
Контроль	202 (58,4)	132 (38,2)	12 (3,5)	156 (22,5)	–	–
РА	131 (55,7)	86 (36,6)	18 (7,7)	122 (26,0)	TT: 0,025; T: 0,14	–
ФН 1	27 (64,3)	12 (28,6)	3, (7,1)	18 (21,4)	–	TT/T <0,05
ФН 2	85 (54,8)	58 (37,4)	12 (7,7)	82 (26,5)	–	
ФН 3	19 (50)	16 (42,1)	3 (7,9)	22 (28,9)	T: 0,18	

Примечание. Полу жирным начертанием отмечены статистически значимые различия ($p < 0,05$). p_1 — ФН vs контроль

Таблица 9

Ассоциации генотипов/аллелей в локусах *STAT4* rs7574865 со степенью функциональной недостаточности при РА в группах пациентов с разной продолжительностью болезни

Лет	Ген, Фн <i>STAT4</i> rs7574865	Генотипы (%)			Минорный аллель (%) Т	p
		GG	GT	TT		
<5	ФН1	14 (66,7)	6 (28,6)	1 (4,8)	8 (19,0)	–
	ФН2	332 (65,3)	16 (32,6)	1 (2,0)	18 (18,3)	–
	ФН3	0 (0)	2 (100)	0 (0)	2 (50)	–
>5	ФН1	8 (66,7)	3 (25)	1 (8,3)	5 (20,8)	–
	ФН2	35 (46,05)¹	35 (46,05)¹	6 (7,9)	47 (30,9)²	¹ <0,00001 ² <0,027
	ФН3	17 (54,8)	12 (38,7)	2 (6,5)	16 (25,8)	–

Примечание. Полу жирным начертанием отмечены статистически значимые различия ($p < 0,05$). ^{1,2}ФН2 (>5 лет) vs ФН2 (<5 лет)

При высоком уровне значимости установлены различия между группами пациентов с наиболее распространенной 2-ой степенью ФН по частоте гетерозигот GT в локусе *STAT4* rs7574865 и по сумме генотипов, содержащих хотя бы один минорный аллель, у пациентов, страдающих РА более 5 лет по сравнению с более коротким сроком заболевания. Показатель отношения шансов для генотипа GT составил OR = 17,77 [9,05–34,88] $p < 0,0001$; для суммы генотипов GT+TT — OR = 22,88 [11,78–44,44] $p < 0,0001$; для T-аллеля — OR = 1,98 [1,07–3,68] $p = 0,028$, что в совокупности свидетельствует о высоком рисковом потенциале аллеля T локусе *STAT4* rs7574865 для развития ФН этой степени при длительности заболевания более 5 лет. Вышеупомянутое подкрепляется нашими данными о том, что для пациентов, носителей минорного аллеля T, характерно более тяжелое течение РА (стадии STIII и STIV).

Таким образом, молекулярные варианты полиморфизма rs7574865 гена *STAT4* не только увеличивают риск развития РА, но и оказывают влияние на изученные клинические показатели патологического процесса, в частности сопряжены с высокой активностью заболевания и более высокой (СТIII–IV) стадией болезни, а также с ФН 2-ой степени у пациентов с РА с продолжительностью заболевания более 5 лет.

Ассоциация полиморфного локуса rs7574865 гена *STAT4* с чувствительностью к развитию РА впервые была выявлена в исследовании «случай-контроль» для когорты жителей Северной Америки и шведской когорты [18]. Затем значение rs7574865 гена *STAT4* как маркера предрасположенности к РА было показано для других европейских популяций [9] и подтверждено в мета-исследовании для европеоидного населения [19]. Аналогичные результаты получены нами и для белорусской популяции. В патогенезе РА, как и любого аутоиммунного заболевания, сопровождающегося воспалительным процессом, главенствующую роль играют цитокины [1]. *STAT4* входит в семейство генов *STAT1–STAT4* и рассматривается как ключевой иммуномодулятор, однонуклеотидные полиморфизмы гена которого ассоциированы со многими аутоиммунными заболеваниями человека, в том числе и РА [20]. Протеины семейства STAT, локализованные в цитоплазме, активируются различными цитокинами и, после фосфорилирования и димеризации, перемещаются в ядро, где регулируют экспрессию многих генов. В свете этих сведений связь гена *STAT4* и, в частности, полиморфизма rs7574865 с риском развития РА и других аутоиммунных болезней, в том числе системной красной волчанки, является, по видимому, причинно-обусловленной. Таким образом, литературные и наши данные свидетельствуют о том, что полиморфизм rs7574865

гена *STAT4* является эффективным маркером повышенного риска развития РА для популяций европейского происхождения.

Важно отметить, что вовлеченность полиморфизма rs7574865 гена *STAT4* в патогенез РА продемонстрирована также его влиянием на основные показатели клинического течения РА у когорты белорусских пациентов, сильно гетерогенной по продолжительности болезни (от 0,15 месяца до 54,87 лет). Ассоциация аллелей и генотипов по локусу rs7574865 с показателями клинического течения РА была показана и для испанской когорты, которая была сформирована из пациентов, страдающих этим заболеванием не более одного года на момент включения в исследование. Дальнейшее двухлетнее наблюдение за пациентами этой когорты позволило установить, что у пациентов гомозиготных по аллелю Т развивается более тяжелая форма болезни с высокой активностью и более тяжелой стадией болезни [21]. Результаты данной работы дают основания полагать, что генетический маркер rs7574865 гена *STAT4* может использоваться и для прогнозирования характера течения РА.

Заключение

Связь генетических вариантов полиморфного локуса rs7574865 гена *STAT4* с клиническими показателями ревматоидного артрита (РА) (активность заболевания, рентгенологическая стадия заболевания и степень функциональной недостаточности) была оценена в когорте белорусских пациентов. Гомозиготный по минорному аллелю генотип ТТ ассоциирован с РА во всей выборке пациентов ($p = 0,0094$) и встречается статистически значимо чаще в подгруппе пациентов с высокой активностью заболевания (СА3) ($p = 0,0023$). При анализе влияния аллелей генотипов на стадию заболевания у пациентов, стратифицированных по продолжительности заболевания (менее или более 5 лет) выявлена ассоциация генотипа GT с тяжелым течением (СТIII и СТIV) не зависимо от продолжительности болезни. Можно полагать, что данный генотип способствует более выраженной тяжести болезни для всей гетерогенной по продолжительности заболевания когорты пациентов с РА. В подгруппе пациентов с 2-ой степенью функциональной недостаточности повышенные частоты гете-

розигот GT и суммы генотипов GT + TT, содержащих хотя бы один минорный аллель Т, были статистически значимо ассоциированы с продолжительностью болезни более 5 лет. Полученные данные указывают на высокий рискованный потенциал аллеля Т и гомозиготного генотипа TT относительно более тяжелого течения заболевания.

Статья подготовлена в ходе выполнения задания 6.4 научно-технической программы Союзного государства «ДНК-идентификация» (2017–2021 гг.).

Авторы искренне благодарят В. Е. Ягура, доктора медицинских наук, профессора второй кафедры внутренних болезней УО «Белорусский государственный медицинский университет» и Н. Ю. Достанко, кандидата медицинских наук, доцента второй кафедры внутренних болезней УО «Белорусский государственный медицинский университет» за предоставление образцов биологического материала и сведений о клинических параметрах ревматоидного артрита, а также за полезные советы при обсуждении представленных данных.

Список использованных источников

1. Smolen, J. S. Rheumatoid arthritis / J. S. Smolen, D. Aletaha, I. B. McInnes // *Lancet*. – 2016. – Vol. 388, № 10055. – P. 2023–2038.
2. Ягур, В. Е. Ревматоидный артрит: проблемы диагностики и лечения. 20 лет спустя / В. Е. Ягур, В. Г. Апанасович // Гродно: ГрГУ, 2017. – 606 с.
3. Gene-based genome-wide association analysis in European and Asian populations identified novel genes for rheumatoid arthritis / H. Zhu [et al.] // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11, № 11. – e0167212.
4. Кужир, Т. Д. Ревматоидный артрит: исторические и современные аспекты // *Молекулярная и прикладная генетика: сб науч тр.* – 2018. – Т. 24. – С. 55–73.
5. One year in review 2017: pathogenesis of rheumatoid arthritis / F. Angelotti [et al.] // *Clin Exp Rheumatol*. – 2017. – Vol. 35, № 3. – P. 368–378.
6. Кужир, Т. Д. Полигенная природа ревматоидного артрита // *Экологическая генетика*. – 2019. – Т. 17, № 4. – С. 77–90.

7. Siniauskaya, E. IL6 -174G/C (rs1800795) Polymorphism Rather than IL6R (rs2228145 and rs4845618) Polymorphisms is Associated with Susceptibility to Rheumatoid Arthritis in the Belarusian Population / E. Siniauskaya, T. Kuzhir, V. Yagur, R. Goncharova // *J Genet Genomic Sci.* – 2020. – Vol. 5, № 1. – P. 100015. doi: 10.24966/GGS-2485/100015
8. The biomarkers for genetic predisposition to some connective tissue autoimmune disorders in Belarus / H. Yatskiu [et al.] // *BGRS/SB-2020 Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology*, 06–10 July, 2020, Novosibirsk, Russia. – Abstracts / Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; Novosibirsk State University. – Novosibirsk: ICG SB RAS, 2020. – P. 557–558.
9. Association of STAT4 with rheumatoid arthritis: a replication study in three European populations / G. Orozco [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2008. – Vol. 58, № 7. – P. 1974–1980. doi: 10.1002/art.23549
10. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis / F. C. Arnett [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 1988. – Vol. 31, № 3. – P. 315–324.
11. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria. An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative / D. Aletaha [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2010. – Vol. 62, № 9. – P. 2569–2581.
12. Классификация ревматоидного артрита // Актуальные проблемы современной ревматологии : материалы Респ. науч.-практ. конф., Минск. 19 сент. 2003 г. / под ред. Н. Ф. Сорока. – Минск : БГМУ, 2003. – 156 с.
13. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review / Y. Alamanos [et al.] // *Semin. Arthritis Rheum.* – 2006. – Vol. 36, № 3. – P. 182–188.
14. Сорока, Н. Ф. Количественная клиническая ревматология / Н. Ф. Сорока, В. Е. Ягур. – Минск: Ризола-Принт, 2011. – 96 с.
15. Steinbrocker, O. Therapeutic criteria in rheumatoid arthritis / O. Steinbrocker, C. H. Traeger, R. C. Backerman // *JAMA.* – 1949. – Vol. 140. – P. 659–662.
16. The American College of Rheumatology 1991 revised criteria for the classification of global functional status in rheumatoid arthritis / M. C. Hochberg [et al.] // *Arthr Rheum.* – 1992. – Vol. 35. – P. 498–502.
17. Tarakji, I. Association Between *STAT4* rs7574865 Polymorphism and Rheumatoid Arthritis: Debate Unresolved / I. Tarakji, W. Habbal, F. Monem // *Open Rheumatol. J.* – 2018. – Vol. 12. – P. 172–178.
18. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus / E. F. Remmers [et al.] // *N Engl J Med.* – 2007. – Vol. 357, № 10. – P. 977–986. doi: 10.1056/NEJMoa073003
19. Rs7574865 polymorphism in signal transducers and activators of transcription 4 gene and rheumatoid arthritis: an updated meta-analysis of 28 case-control comparisons / E. P. Gu [et al.] // *International journal of rheumatic diseases.* – 2015. – Vol. 18, № 1. – P. 3–16.
20. STAT4: an immunoregulator contributing to diverse human diseases / Yang [et al.] // *Int. J. Biol. Sci.* – 2020. – Vol. 16, № 9. P. 1575–1585. doi: 10.7150/ijbs.41852
21. The TT Genotype of the *STAT4* rs7574865 Polymorphism Is Associated with High Disease Activity and Disability in Patients with Early Arthritis / A. Lamana [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, № 8. – e43661.

R. I. Goncharova, T. D. Kuzhir, E. S. Sinyavskaya

ASSOCIATION OF *STAT4* RS7574865 POLYMORPHISM WITH THE RISK OF RHEUMATOID ARTHRITIS DEVELOPMENT AND ITS CLINICAL CHARACTERISTICS

State Scientific Institution
“Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus”
27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, Republic of Belarus
e-mail: r.goncharova@igc.by

A cohort of 287 patients with rheumatoid arthritis (RA) showed that molecular variants (minor T allele and homozygous TT genotype) of the *STAT4* rs7574865 polymorphic locus increase the risk of RA development and impact the clinical characteristics of pathological process. Specifically, these variants are associated with high disease activity ($p = 0.0023$) and III-IV roentgenologic stages of the disease, as well as with grade 2 functional impairment in RA patients in case of disease duration more than 5 years. The revealed association of molecular variants of the studied *STAT4* rs7574865 locus with clinical RA characteristics indicates that *STAT4* rs7574865 polymorphism is an effective marker of an increased risk of RA development in the population of the Republic of Belarus.

Keywords: rheumatoid arthritis, genetic polymorphism, rs7574865, *STAT4*, patient clinical status, disease activity measure, roentgenologic stage, functional impairment grade in RA, functional classes of RA.

Дата поступления статьи: 11 марта 2021 г.

И. Ю. Бакутенко¹, И. Д. Гаврильчик¹, Е. В. Сечко², А. М. Чичко², А. В. Сукало², Н. И. Рябоконт¹

РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *IRF5* В ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К ЮВЕНИЛЬНОЙ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКЕ В БЕЛОРУССКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

¹Государственное научное учреждение
«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»

Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

e-mail: i.bakutenko@igc.by

²Учреждение образования

«Белорусский государственный медицинский университет»

Республика Беларусь, 220116, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83

Ген *IRF5* (interferon regulatory factor 5), кодирующий транскрипционный фактор, участвует в регуляции синтеза интерферона и других провоспалительных цитокинов. Предполагается ассоциация гена *IRF5* с ювенильной системной красной волчанкой (юСКВ) — хроническим аутоиммунным заболеванием, которое развивается в детском возрасте и отличается от взрослого подтипа рядом проявлений. Целью представленной работы было проведение пилотного исследования полиморфизма rs2004640 гена *IRF5* среди детского населения Беларуси и его ассоциации с развитием юСКВ. С использованием ПЦР в реальном времени проведено генотипирование образцов ДНК, полученных от пациентов с диагнозом юСКВ (38 чел.) и в группе клинического контроля без аутоиммунных и воспалительных заболеваний (378 чел.). Определена частота минорного аллеля T rs2004640 гена *IRF5* в белорусской популяции детей (в возрасте до 17 лет). Установлено, что генотип rs2004640 TT гена *IRF5* ассоциирован с риском развития юСКВ (OR = 2,27; 95% CI 1,08–4,76; p = 0,035), что после дополнительных исследований может послужить усовершенствованию ранней диагностики юСКВ.

Ключевые слова: ювенильная системная красная волчанка, *IRF5*, генетический полиморфизм.

Введение

Системная красная волчанка (СКВ) — это хроническое аутоиммунное ревматическое заболевание, поражающее большое количество систем и органов человека, которое может привести к значительному ухудшению качества жизни и даже к смерти. Ювенильная форма СКВ (юСКВ), в отличие от взрослой подгруппы, развивается в возрасте до 17 лет и встречается достаточно редко: средняя частота возникновения составляет 0,3–0,9 случаев на 100 тыс. детей в год, а средняя распространенность заболевания достигает 3,3–8,8 на 100 тыс. детей [1]. Это примерно в 10 раз реже, чем у ювенильного идиопатического артрита — наиболее распространенного аутоиммунного ревматического заболевания детей [2]. Среди заболевших юСКВ девочки составляют более 80% случаев, а medianный возраст дебюта заболевания колеблется между 11 и 12 годами, с крайне редкими случаями начала болезни до 5 лет. По сравнению

со взрослой формой СКВ юСКВ имеет более тяжелое течение с быстрым прогрессированием и более высокой смертностью [1].

СКВ и юСКВ характеризуются патологиями соединительной ткани, при этом поражаются микрососуды, кожа и внутренние органы, особенно почки. Патогенетический механизм развития симптомов этих заболеваний включает в себя выработку аутоантител, аутоиммунное воспаление и гибель клеток с выделением дополнительного количества аутоантигенов, что делает нарастающее воспаление хроническим. Вторично возникает поражение микрососудов, на стенках которых откладываются иммунные комплексы аутоантител со своими мишенями. У части пациентов особенно сильно повреждаются капилляры почек, что приводит к развитию волчаночного нефрита, зачастую определяющего выживаемость пострадавших [3].

Ювенильная СКВ, как и взрослая форма СКВ, является многофакторным заболеванием,

причины которого сочетают воздействие внешней среды (ультрафиолет, некоторые лекарственные препараты, инфекции и другие средовые факторы) и генетическую предрасположенность. Генетическая составляющая включает комплексы генов, участвующих в таких клеточных процессах, как апоптоз и дальнейшее устранение апоптотических телец, нетоз и утилизация внеклеточных нуклеиновых кислот, регуляция синтеза интерферонов I типа и элиминация внутриклеточных нуклеиновых кислот, синтез компонентов комплемента и формирование центральной иммунологической толерантности [4].

Среди этих генов связь со взрослой формой заболевания [5, 6], а также с юСКВ в отдельных популяциях [6, 7] установлена для гена *IRF5*. Этот ген интересен тем, что кодирует интерферон регулирующий фактор IRF5, белок из группы транскрипционных факторов, которые вовлечены во множественные процессы в организме, включая вирус-опосредованную активацию интерферона, клеточный рост и дифференциацию, апоптоз и активность иммунной системы. Транскрипционный фактор IRF5 помимо своей основной функции — регуляции экспрессии гена интерферона *IFN α* — участвует также в регуляции активности генов других провоспалительных цитокинов и известен как фактор предрасположенности к ряду аутоиммунных расстройств (ревматоидного артрита, рассеянного склероза, синдрома Шегрена, СКВ) в самых разных этнических группах [8]. *IFN α* — это типичный пример интерферонов I типа, которые являются провоспалительными цитокинами и активно синтезируются в ответ на проникновение антигенов в организм. Однако повышенный уровень *IFN α* в крови способен привести к потере иммунологической толерантности и усилению пролиферации аутореактивных Т- и В-клеток. Известно, что у пациентов с СКВ выражен повышенный уровень *IFN α* , а порядка 50% заболевших имеют измененный под действием *IFN α* паттерн экспрессии моноцитов. Более того, использование препаратов *IFN α* при лечении вирусного гепатита С приводит к развитию волчаночноподобных состояний, исчезающих с прекращением приема препарата [8].

Из всех известных полиморфизмов гена *IRF5* хорошо изучен в отношении риска раз-

вития СКВ в этнически различных популяциях [9, 10] rs2004640 (T>G), расположенный в донорном сайте сплайсинга интрона 3 этого гена. Однако данных о влиянии носительства замены в локусе rs2004640 на развитие юСКВ чрезвычайно мало [6, 7].

Исходя из всего вышеизложенного, а также принимая во внимание необходимость поиска генетических маркеров предрасположенности к юСКВ, целью нашей работы было изучение частот минорного аллеля и генотипов полиморфизма rs2004640 (G/T) гена *IRF5* в популяции белорусских детей и связи этих генетических вариантов с риском развития юСКВ. Ниже представлены результаты проведенного нами пилотного исследования на небольшой выборке пациентов с диагнозом юСКВ.

Материалы и методы

Участники исследования

В проведенном исследовании «случай – контроль» принимали участие пациенты, проходившие в 2012–2020 гг. лечение в Учреждении здравоохранения «2-я городская детская клиническая больница» г. Минска, являющемся клинической базой 1-й кафедры детских болезней Учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет». Все пациенты включены в исследование после получения информированного согласия родителей.

Группа юСКВ состояла из 38 пациентов с дебютом заболевания до 17 лет, из них 34 — женского пола. Диагноз юСКВ был поставлен в соответствии с международными критериями EULAR/ACR [11]. Среднее значение возраста пациентов составило $13,8 \pm 3,0$ лет, средний возраст дебюта заболевания — $11,9 \pm 3,2$ лет.

Группа сравнения (клинического контроля) состояла из 378 пациентов без аутоиммунных, острых или хронических воспалительных заболеваний, со средним возрастом $14,4 \pm 2,5$ лет (из них 163 — женского пола).

Выделение ДНК и генотипирование

Тотальная ДНК выделена стандартным фенол-хлороформным методом из образцов венозной крови, полученной в стерильные пробирки с ЭДТА [12]. Оценка концентрации и чистоты тотальной ДНК проведена с использованием спектрофотометра NanoDrop 2000 (*Thermo Fisher Scientific*, США). Образцы ДНК до начала генотипирования были доведе-

ны до концентрации 100 нг/мкл и хранились в лабораторной коллекции при -20°C .

Генотипирование всех образцов ДНК проведено с использованием ПЦР в реальном времени. Синтез и поставка праймеров и реактивов для ПЦР осуществлялась ОДО «Праймтех» (Республика Беларусь) (табл. 1). Стандартная ПЦР проводилась в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 100 нг геномной ДНК, 2х премикс для ПЦР-РВ, праймеры, дважды меченные флуоресцентные зонды и воду (mQ), на приборе QuantStudio 5 (*Thermo Fisher Scientific*, США).

Статистический анализ

Статистический анализ полученных данных проводился с использованием программного пакета *SNPassoc* для R v4.0.3 [13] и поправкой на пол. Наличие ассоциации генотипа/аллеля с заболеванием считали значимым при $p < 0,05$, а направленность связи определяли по величине отношения шансов (OR — odd ratio) и 95% доверительного интервала (95% CI — 95% confidence interval). Анализ сцепления генетических локусов осуществлялся с помощью веб-инструмента *LDpair* [14].

Таблица 1

Праймеры, зонды и условия ПЦР для генотипирования локуса rs2004640

Название олигонуклеотидов	Последовательность олигонуклеотидов	Условия ПЦР
Fw	5' TGAAGACTGGAGTAGGGCG	10 мин 95°C 40 циклов: 15 с 95°C 30 с 61°C 20 с 72°C
Rv	5' GAGGCGCTTTGGAAGTCCC	
PrT	5' FAM-CGGGTGGGTGCCTACAGCAG-BHQ1	
PrG	5' ROX-CGGGGGGGTGCCTACAGCAG-BHQ2	

Результаты и обсуждение

Распределение частот генотипов и аллелей полиморфизма rs2004640 гена *IRF5* в исследуемой группе контроля соответствовали закону Харди-Вайнберга. Частота минорного аллеля Т в этой же группе оказалась ниже среднего значения, характерного для Западной Европы (46,2% против 53,2%), и даже находилась несколько ниже диапазона межпопуляционных колебаний в этом регионе (от 50,0% до 57,0%) [15]. Однако сравнение с данными по российской популяции (42,6%) [16] показывает, что частота Т аллеля в белорусской популяции занимает промежуточное значение между Западной Европой и Россией, что укладывается в представление об общей эволюционной истории этих популяций.

Результаты сравнительного анализа распределения частот генотипов и аллелей в группах пациентов с юСКВ и контроля представлены в таблице 2. По аналогии со взрослой формой СКВ установлена повышенная частота аллеля Т в группе с юСКВ (OR = 1,69 при $p = 0,042$), что соответствует опубликованным ранее данным по другим популяциям [6, 7].

Анализ распределения генотипов показал разнонаправленные тенденции относитель-

но риска развития юСКВ: генотип ТТ значимо чаще встречается среди пациентов с юСКВ (OR = 2,27 при $p = 0,035$), тогда как несущий одну рисковую аллель генотип GT имеет тенденцию к меньшему распространению, чем в контрольной группе (OR = 0,73 при $p > 0,05$). С учетом того, что доминантная генетическая модель GT+TT не связана значимо с риском развития юСКВ ($p = 0,248$), мы предполагаем, что именно носительство гомозиготного генотипа ТТ является фактором риска развития юСКВ.

Молекулярно-генетические пути вовлечения аллеля Т (или генотипа ТТ) rs2004640 в патогенез юСКВ не изучены. Известно, что замена нуклеотидов G/T в локусе rs2004640, находящемся в интроне гена *IRF5*, приводит к переключению альтернативного сплайсинга первого экзона с 1А на 1В. Однако, функциональная роль этой замены едва ли велика по причине того, что количество таких 1В-несущих альтернативных транскриптов гораздо меньше, чем исходных 1А-несущих, а данных, подтверждающих значимость альтернативного сплайсинга в экспрессии белка *IRF5*, нет [17]. Тем не менее, как это уже указывалось выше, аллель Т rs2004640 показывает в мета-анализах значимую ассоциацию с развитием СКВ у взрослых пациентов [9, 10].

Таблица 2

Распределение генотипов и аллелей локуса rs2004640 среди пациентов с юСКВ и контрольной группы

Генотип / аллель	Контроль, n (%)	юСКВ, n (%)	OR [95% CI]	p
GG	112 (29,6)	7 (18,4)	1,00	–
GT	183 (48,4)	17 (44,7)	0,73 [0,36–1,47]	0,381
TT	83 (22,0)	14 (36,8)	2,27 [1,08–4,76]	0,035
GT+TT	266 (70,4)	31 (81,6)	1,64 [0,68–3,95]	0,248
G	53,8	40,8	1,00	–
T	46,2	59,2	1,69 [1,01–2,81]	0,042

Наиболее вероятный, с нашей точки зрения, механизм связи аллеля с заболеваемостью СКВ и юСКВ — это сцепление локуса rs2004640 с инсерционно-делеционным полиморфизмом rs77571059 (-/GCGGG), который расположен на расстоянии в 388 п. н. выше, в области промотора, и при амплификации создает дополнительные сайты посадки фактора транскрипции Sp1, что увеличивает экспрессию белка IRF5 в ответ на TLR-опосредованную активацию в миелоидных клетках [17, 18]. Проведенный нами биоинформатический анализ с использованием веб-инструмента *LDpair* показал наличие сцепления локусов rs77571059 GCGGG и rs2004640 T гена *IRF5* (нормализованный коэффициент неравновесности $D' = 0,981$, коэффициент корреляции $r^2 = 0,706$), что частично подтверждает выдвинутое нами предположение.

Продолжая обсуждение данного предположения, необходимо упомянуть следующие данные. Согласно D. Li с соавторами [18], носители гомозиготного гаплотипа *IRF5* rs77571059 GCGGG — rs2004640 T имеют измененные паттерны экспрессии нейтрофилов и повышенный уровень спонтанного нетоза. Спонтанный нетоз активирует выработку IFN α плазматоидными дендритными клетками, а IFN α , в свою очередь, необходим для превращения В-клеток в плазматические клетки, а также для подготовки к нетозу нейтрофилов [18]. Как уже упоминалось выше, пациенты с СКВ имеют повышенные уровни IFN α и спонтанного нетоза, что может быть связано с повышенной активностью *IRF5*. Из-за того, что экспрессия гена *IRF5* активируется интерферонами I типа, возникновение положительной обратной связи с IFN α может рассматриваться как один из возможных путей патогенеза взрослой и ювенильной форм СКВ.

Заключение

Изучены частоты генотипов и аллелей полиморфизма rs2004640 гена *IRF5* в белорусской популяции детей и их связь с риском возникновения юСКВ. Установлено, что частота минорного аллеля T в белорусской популяции занимает промежуточное значение по сравнению с популяциями Западной Европы и России. Выявлено, что генотип rs2004640 TT гена *IRF5* ассоциирован с риском возникновения юСКВ. Полученные результаты дают новые знания о генетической структуре белорусской популяции, а также о биомаркерах риска развития юСКВ. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о важности данного исследования не только для изучения генетических особенностей белорусской популяции, но и для юСКВ в целом. Кроме того, они указывают на необходимость проведения дальнейших исследований с целью лучшего понимания генетических сходств и различий между взрослой и ювенильной формами СКВ.

Работа выполнена в рамках задания 6.4 «Молекулярно-генетическая оценка риска аутоиммунных заболеваний» НТП Союзного государства «ДНК-идентификация» (2017–2021 гг.).

Авторы выражают благодарность детям и их родителям, давшим согласие на участие в исследовании; медицинским работникам, принявшим участие в сборе материала, а также сотрудникам лаборатории молекулярных основ стабильности генома Института генетики и цитологии НАН Беларуси, принимавшим участие в 2012–2017 гг. в создании лабораторной коллекции ДНК для использования в научных целях.

Список использованных источников

1. Levy, D. M. Systemic Lupus Erythematosus in Children and Adolescents / D. M. Levy, S. Kamphuis // *Pediatric Clinics of North America*. – 2012. – Vol. 59, № 2. – P. 345–364.
2. Prevalence and incidence of juvenile idiopathic arthritis: A systematic review / S. Thierry [et al.] // *Joint Bone Spine*. – 2014. – Vol. 81, № 2. – P. 112–117.
3. Характеристика системной красной волчанки и люпус-нефрита у детей в Республике Беларусь и Республике Татарстан / Т. П. Макарова [и др.] // *Росс. вестн. перинатол. педиатр.* – 2019. – Т. 64, № 5. – С. 199–203.
4. Кучинская, Е. М. Генетические аспекты патогенеза системной красной волчанки у детей / Е. М. Кучинская, Е. Н. Суспицын, М. М. Костик // *Современная ревматология*. – 2020. – Т. 14, № 1. – С. 101–107.
5. Beal, E. IRF5 and B cells in lupus development / E. Beal // *Nat Rev Rheumatol*. – 2010. – Vol. 6, № 8. – P. 437–437.
6. Identification of new SLE-associated genes with a two-step Bayesian study design / D. L. Armstrong [et al.] // *Genes Immun.* – 2009. – Vol. 10, № 5. – P. 446–456.
7. Interferon regulatory factor 5 gene polymorphism in Egyptian children with systemic lupus erythematosus / A. Hammad [et al.] // *Lupus*. – 2017. – Vol. 26, № 8. – P. 871–880.
8. Lazzari, E. Regulations of IRF5 activity in the TLR7 and type I IFN pathways / E. Lazzari. – 2019 – P. 11307623 Bytes.
9. Association of IRF5 rs2004640 polymorphism and systemic lupus erythematosus: A meta-analysis / J. Wang [et al.] // *Int J Rheum Dis.* – 2019. – Vol. 22, № 9. – P. 1598–1606.
10. Bae, S. C. Association between the interferon regulatory factor 5 rs2004640 functional polymorphism and systemic lupus erythematosus: an updated meta-analysis / S. C. Bae, Y. H. Lee // *Lupus*. – 2019. – Vol. 28, № 6. – P. 740–747.
11. 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus / M. Aringer [et al.] // *Ann Rheum Dis*. – 2019. – Vol. 78, № 9. – P. 1151–1159.
12. Green, M. R. Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian blood using proteinase K and phenol / M. R. Green, J. Sambrook // *Cold Spring Harb Protoc.* – 2017. – Vol. 2017, № 10. – P. pdb.prot093492.
13. SNPassoc: an R package to perform whole genome association studies / J.R. Gonzalez [et al.] // *Bioinformatics*. – 2007. – Vol. 23, № 5. – P. 654–655.
14. Machiela, M. J. LDlink: a web-based application for exploring population-specific haplotype structure and linking correlated alleles of possible functional variants: Fig. 1. / M. J. Machiela, S. J. Chanock // *Bioinformatics*. – 2015. – Vol. 31, № 21. – P. 3555–3557.
15. The 1000 Genomes Project Consortium. A global reference for human genetic variation / The 1000 Genomes Project Consortium // *Nature*. – 2015. – Vol. 526, № 7571. – P. 68–74.
16. Krylov, M. Yu. Relating interferon regulatory factor 5 rs2004640 Gene polymorphism to increased risk of systemic sclerosis in the patients: Russian Federation cohort / M. Yu. Krylov, L. P. Ananieva, I. A. Guseva // *Russ Open Med J*. – 2020. – Vol. 9, № 4. – P. e0410.
17. Comprehensive evaluation of the genetic variants of interferon regulatory factor 5 (IRF5) reveals a novel 5 bp length polymorphism as strong risk factor for systemic lupus erythematosus / S. Sigurdsson [et al.] // *Human Molecular Genetics*. – 2008. – Vol. 17, № 6. – P. 872–881.
18. IRF5 genetic risk variants drive myeloid-specific IRF5 hyperactivation and presymptomatic SLE / D. Li [et al.] // *JCI Insight*. – 2020. – Vol. 5, № 2. – P. e124020.

I. Y. Bakutenko¹, I. D. Haurylchyk¹, E. V. Sechko², A. M. Tchitchko², A. V. Sukalo², N. I. Ryabokon¹

ROLE OF *IRF5* GENE POLYMORPHISM IN PREDISPOSITION TO JUVENILE-ONSET SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS IN THE BELARUSIAN POPULATION

¹State Scientific Institution

“Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus”

27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, Republic of Belarus

e-mail: i.bakutenko@igc.by

²Educational Institution “Belarusian State Medical University”

83 Dzerzhinski Ave., 220116 Minsk, Republic of Belarus

The *IRF5* (interferon regulatory factor 5) gene encoding a transcription factor is involved in the regulation of interferon synthesis and other proinflammatory cytokines. It is assumed that the *IRF5* gene is associated with juvenile-onset systemic lupus erythematosus (jSLE), a chronic autoimmune disease that develops in childhood and differs from the adult subtype of SLE in a number of its manifestations. The aim of the presented work was to conduct a pilot study of *IRF5* rs2004640 polymorphism in the population of children in Belarus and its association with the development of jSLE. Genotyping of DNA samples was performed using real-time PCR in a group of patients diagnosed with jSLE (38 people) and in the clinical control group without autoimmune and inflammatory diseases (378 people). The frequency of the *IRF5* rs2004640 minor T allele was determined in the Belarusian population of children (under the age of 17). It was found that the rs2004640 TT genotype is associated with the risk of the jSLE development (OR = 2.27; 95% CI 1.08–4.76; p = 0.035) that after further investigations may improve an early diagnosis of jSLE.

Keywords: juvenile-onset systemic lupus erythematosus, *IRF5*, genetic polymorphism.

Дата поступления статьи: 26 февраля 2021 г.

К. Ю. Песоцкая, А. Л. Лагоненко, А. Н. Евтушенков

ПЛЕЙОТРОПНЫЙ ЭФФЕКТ МУТАЦИИ В ГЕНАХ БИОСИНТЕЗА ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ *ERWINIA AMYLOVORA*

Белорусский государственный университет
Республика Беларусь, 220030, г. Минск, пр-т Независимости, 4
e-mail: lagonenkoal@mail.ru

В данной работе нами был получен делеционный мутант *Erwinia amylovora* по генам *waaC*, *waaD*, *waaF*, *waaL*, *wabK* и *wabM*, кодирующим ферменты, участвующие в синтезе липополисахаридов наружной мембраны бактерий, а также изучено фенотипическое проявление полученной мутации. Показано, что полученный мутант обладает повышенной способностью к автоагрегации и формированию биопленок, однако характеризуется сниженной подвижностью и продукцией экзополисахарида левана. Кроме того, делеция генов биосинтеза липополисахаридов привела к утрате вирулентности мутантного штамма. Полученные нами данные указывают на важнейшую роль липополисахаридного слоя в вирулентности бактерий *E. amylovora*.

Ключевые слова: *Erwinia amylovora*, бактериальный ожог, биопленка, липополисахариды, делеционный мутант.

Введение

Известно, что микроорганизмы в естественной среде обитания существуют главным образом в сложно организованных микробных сообществах, получивших название «биопленки». Бактериальная биопленка представляет собой ассоциацию микроорганизмов, клетки которых прикреплены к поверхности и к друг другу и окружены полимерным матриксом. Обычно внеклеточный матрикс состоит из белков, экзополисахаридов, липидов и внеклеточной ДНК и синтезируется клетками бактерий в биопленке. Образование биопленки предоставляет одиночным клеткам ряд преимуществ: бактерии становятся более устойчивыми к защитным системам растений, действию антибиотиков и изменениям условий окружающей среды [1, 2].

Формирование биопленок считается одним из основных условий для успешного развития бактериозов [3]. Бактериальный ожог — одно из самых опасных заболеваний растений семейства *Rosaceae*, вызываемое грамотрицательной бактерией *Erwinia amylovora*. Для Республики Беларусь и стран, входящих в Европейскую Организацию За-

щиты Растений, данный фитопатоген является карантинным объектом [4]. Несмотря на значительные усилия по борьбе с бактериальным ожогом во всем мире, болезнь по-прежнему вызывает большие потери урожая и гибель деревьев. Понимание молекулярных механизмов формирования биопленок бактериями *E. amylovora* позволит разработать эффективные подходы к контролю бактериального ожога.

У грамотрицательных бактерий липополисахариды являются одним из важнейших компонентов внешней мембраны, обеспечивающих ее структурную целостность. Липополисахариды также обеспечивают адгезию клеток на различных поверхностях биотической и абиотической природы благодаря ориентации и расположению молекул ЛПС в клеточной стенке [5]. Кроме того, у *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* и представителей рода *Shigella* липополисахариды являются важнейшими факторами вирулентности [6–9]. В данной работе сделан акцент на изучении роли генов биосинтеза липополисахаридов в процессе формирования биопленок бактериями *E. amylovora*.

Материалы и методы

Использованные в работе штаммы бактерий и плазмиды представлены в таблице 1, использованные в работе праймеры представлены в таблице 2. Получение делеционного мутанта *E. amylovora* по генам, участвующим в образовании биопленок, проводилось методом «PCR-based one-step inactivation of chromosomal genes» [10].

Проверка вирулентности полученного делеционного мутанта проводится на незрелых плодах груши по стандартной методике [11]. Способность клеток *E. amylovora* вызывать развитие реакции гиперчувствительности оценивается путем инфильтрации в листья табака.

Продукция левана клетками *E. amylovora* стандартно оценивается по измерению активности левансуказы — фермента, отвечающего за синтез полисахарида. После осаждения бак-

териальных клеток к надосадочной жидкости добавляется LS-буфер (50 мМ К-фосфатный буфер, pH 7,0; 2 М сахароза; 0,05% NaN₃) в соотношении 1:1. После инкубации при 28 °С в течение 24 часов измеряется оптическая плотность раствора при 600 нм [12].

Количественная оценка интенсивности формирования биопленок проводится методом, описанным в работе [13], с некоторыми модификациями. Ночная культура *E. amylovora* разводится средой инкубации до оптической плотности 0,05. Полученные суспензии вносятся в лунки стерильного 96-луночного планшета и инкубируются при 28 °С в течение 48 и 72 часов. После окрашивания клеток биопленки 1%-ным раствором генцианового фиолетового измеряется оптическая плотность при длине волны 595 нм. Значения пересчитываются на значения оптической

Таблица 1

Бактериальные штаммы и плазмиды

Штамм или плазида	Характеристика	Источник
Штаммы <i>Erwinia amylovora</i>		
<i>Erwinia amylovora</i> E2	Штамм дикого типа, выделен из побегов яблони в Мядельском районе в 2007 году	Коллекция кафедры молекулярной биологии
<i>E. amylovora</i> E2 <i>ΔwaaCDL-wabKM</i>	Km ^R ; E2 <i>ΔwaaCDFL-wabKM</i>	Это исследование
Плазмиды		
pKD13	Km ^R , FRT cat FRT PS1 PS2 oriR6K rgbN	[10]
pKD46	Ap ^R , PBAD gam bet exo pSC101 oriTS	[10]

Примечание. Km^R, Ap^R — устойчивость к канамицину и ампициллину соответственно

Таблица 2

Использованные в работе праймеры

Праймер	Последовательность (5'–3')	Источник
Праймеры, использованные для мутагенеза целевых генов у <i>E. amylovora</i>		
WaaF	GCAAAACAGACGGATTTTGGACAAGAACATATCCACCTGAG-GATGGCGCAGCGATTGTGTAGGCTGGAGCT	Это исследование
WaaR	ATGATTATCGTTACCGGCGGTGCTGGATTAATTGGTAGTAACAT-TATTAATCCGGGGATCCGTCGACC	-/-
Праймеры, использованные для подтверждения делеции целевых генов		
WaaPF	CCGCTCGAGACCGGGGCTGTGTTACGTTGATCC	Это исследование
Km1	CAGTCATAGCCGAATAGCCT	[10]

плотности культуры для каждой из лунок соответственно.

Способность клеток *E. amylovora* к автоагрегации определяется согласно методике, описанной у Kharadi et al. Клетки исследуемых штаммов выращиваются с аэрацией в течение 18 часов, после чего выдерживаются в условиях отсутствия аэрации в течение часа при 28 °С. Затем содержимое пробирок взбалтывается на лабораторном вортексе в течение 15 с. Фактор автоагрегации для клеток *E. amylovora* рассчитывается формуле:

$$Aa = OD_1 / OD_0,$$

где OD_0 — значение оптической плотности суспензии клеток до взбалтывания; OD_1 — значение оптической плотности суспензии клеток после 15-секундного взбалтывания [14].

Для проведения тестов на подвижность клеток бактерий используется полноценная и минимальная полужидкие агаризованные среды. Ночная культура штаммов *E. amylovora*, предварительно ресуспендированная в На-фосфатном буфере (рН 7,4), наносится на поверхность необходимой агаризованной среды. Диаметр макроколонии бактерий учитывается через 24, 48 и 72 часа инкубации при 28 °С [12].

Статистическая обработка результатов проводится в программе GraphPad Prism 8. Для оценки достоверности различий применяется t-критерий Стьюдента для независимых выборок в модификации Уэлча (сравнение средних без какого-либо предположения о равенстве дисперсий). Различия считались значимыми при уровне $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Обзор литературных данных, а также биоинформационный анализ вовлеченных в формирование биопленок генов у бактерий, принадлежащих к порядку *Enterobacterales*, позволил выявить в геноме *E. amylovora* E2 гены, потенциально вовлеченные в образование биопленки. Гены *waaC*, *waaD*, *waaF*, *waaL*, *wabK*, *wabM* кодируют ферменты, участвующие в синтезе липополисахаридов — основных компонентов внешней мембраны грамотрицательных бактерий [15, 16]. В геноме возбудителя бактериального ожога эти гены локализованы на участке хромосомы с 114401 по 120761 н. (рис. 1).

Удобным методом получения делеций интересующих генов является «PCR-based one-step inactivation of chromosomal genes», предложенный Даценко и Воннером для бактерий *E. coli*. Для инактивации генов *waaCDFL-wabKM* на первом этапе работы были сконструированы праймеры для амплификации гена устойчивости к канамицину в составе плазмиды рKD13, несущие на 5'-конце последовательности (50 н.), соответствующие началу или концу делетируемой области генома *E. amylovora*. Полученные с помощью таких праймеров ПЦР-продукты были трансформированы в клетки *E. amylovora* E2, несущие хелперную плазмиду рKD46 и выращенные в условиях индукции рекомбиназы. В результате проделанной работы был отобран устойчивый к канамицину штамм. Наличие делеции генов биосинтеза липополисахаридов было подтверждено методом ПЦР с праймерами к областям, фланкирующим делецию, а также с внутренним праймером к гену устойчивости к канамицину (Km1).

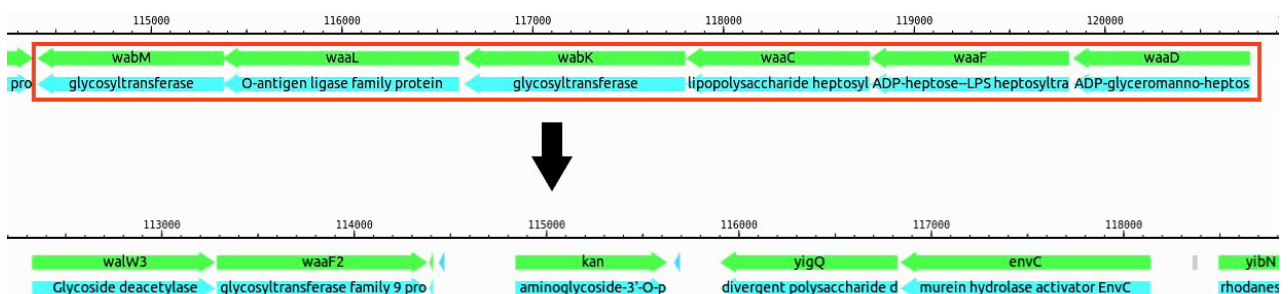


Рис. 1. Структура участка хромосомы *E. amylovora* E2, содержащего гены биосинтеза ядра ЛПС. В результате мутагенеза с использованием метода «PCR-based one-step inactivation of chromosomal genes» гены *waaCDFL-wabKM* были замещены на ген устойчивости к канамицину

Ранее, в работе С. Berry et al., был получен штамм *E. amylovora*, мутантный по гену *waalL*. Данный ген ответственен за синтез О-антигенлигазы, единственного из кодируемых *waal* локусом ферментов, отвечающего за присоединение О-антигена к внешнему ядру липида А молекулы липополисахарида. Было показано, что клетки *E. amylovora* $\Delta waalL$ обладают сниженной вирулентностью [17]. Для изучения эффекта делеции всего оперона *waalCDFL-wabKM* на вирулентность *Erwinia amylovora*, суспензии клеток штаммов E2 и $\Delta waalCDFL-wabKM$ были инокулированы в ткани незрелых плодов груши. Как видно из рисунка 2, клетки делеционного мутанта полностью авирулентны (не способны вызывать симптомы бактериального ожога).

В реализации процесса адгезии и образования биопленок важную роль играет строение клеточной стенки бактерий, наличие пилей и фимбрий и продукция клетками микроорганизмов экзополисахаридов. Начальный этап формирования биопленок представляет собой обратимую адгезию клеток на поверхности биотической или абиотической природы, опосредованную наличием во внешней мембране липополисахаридов, а также пилей. Экзополисахариды,

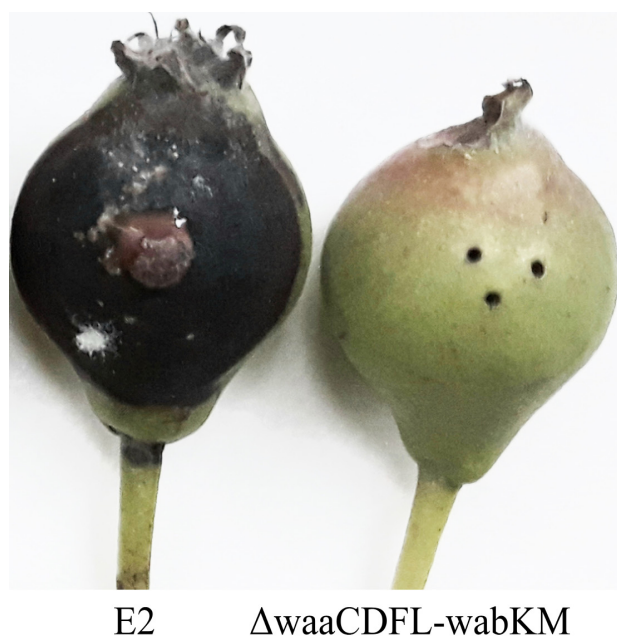


Рис. 2. Симптомы бактериального ожога на плодах и цветках груши при искусственном заражении клетками *E. amylovora* E2 и $\Delta waalCDFL-wabKM$

в свою очередь, обеспечивают стабилизацию трехмерной структуры уже зрелой биопленки, а также защищают бактериальные клетки от осмотического стресса, изменений pH окружающей среды и воздействия УФ-излучения [18]. Клетки *E. amylovora* продуцируют два типа экзополисахаридов, амиловоран и леван. По имеющимся в литературе данным штамм *E. amylovora* Δlsc , не способный синтезировать леван, обладал сниженной вирулентностью, низкой автоагрегационной активностью и не образовывал биопленки. Также было показано, что клетки данного штамма располагались в мезофилле листьев растений-хозяев, в отличие от штаммов дикого типа, локализующихся в сосудах ксилемы. Данный факт может свидетельствовать о том, что правильная локализация клеток ведет к надлежащему развитию симптомов бактериального ожога, что не было продемонстрировано для клеток *E. amylovora* Δlsc [19].

Эксперименты по оценке количества левана показали, что уровень продукции этого экзополисахарида клетками $\Delta waalCDFL-wabKM$ снижен более чем в два раза по сравнению с E2 (рис. 3).

На следующем этапе работы нами была изучена подвижность клеток бактерий $\Delta waalCDFL-wabKM$ и E2 на питательных средах различного состава (рис. 4).

Как видно из рисунка 4, при выращивании *E. amylovora* как на минимальной среде M9, так и на полноценной среде LB, подвижность клеток мутанта была значительно снижена по сравнению с бактериями дикого типа. Сходные данные были получены при изучении эффекта мутаций по генам биосинтеза ЛПС у других бактерий. Известно, что штаммы *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, не способные синтезировать молекулы липополисахаридов, обладают сниженной подвижностью клеток, однако продуцируют большое количество слизи. [20]. Бактерии *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia cenocepacia*, *Pectobacterium atrosepticum* и *Pseudomonas aeruginosa* с нарушенной структурой ЛПС также обладают сниженной подвижностью [21–23].

Учитывая тот факт, что инактивация генов биосинтеза липополисахаридов приво-

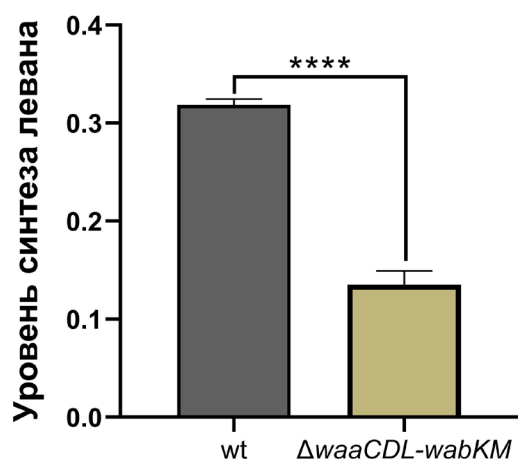


Рис. 3. Продукция полисахарида левана клетками *E. amylovora* E2 и $\Delta waaCDL-wabKM$. Уровень значимости P был рассчитан с использованием теста Уэлча (**** $P < 0,0001$)

дит к снижению подвижности клеток, было интересно изучить эффект такой мутации на способность образовывать биопленки. Исходя из данных, представленных на рисунке 5, через 72 часа инкубации образование биопленок у делеционного мутанта достоверно увеличено по сравнению с клетками исходного штамма.

В настоящее время известно, что образование биопленок бактериальными клетками — многоступенчатый процесс, включающий в себя обратимое и необратимое прикрепление планктонных клеток к субстрату, созревание и рост уже зрелой биопленки [2, 3]. Поэтому на следующем этапе работы мы исследовали

способность клеток мутантного штамма к автоагрегации как первому этапу в формировании бактериальной биопленки. Как видно из представленных данных, клетки мутанта $\Delta waaCDL-wabKM$ агрегировали ожидаемо эффективнее, чем контроль (рис. 6).

Важная роль ЛПС в процессе формирования бактериальных биопленок была показана во многих исследованиях. Например, при инактивации генов *waaF*, *waaG*, *waaP*, *waaC*, *waaO*, *waaR*, *waaQ*, *waaY* у бактерий *Escherichia coli* была выявлена сниженная способность к образованию биопленок, а также повышенная способность к автоагрегации [24]. В другом исследовании было выяснено, что по меньшей мере восемь генов, отвечающих за синтез липополисахаридов наружной мембраны *E. coli*, принимают участие в процессе образования биопленок клетками бактерий [25]. Противоположный эффект делеции гена *waaC* на образование биопленок был описан у *Shigella flexneri*. В результате проделанной работы авторами было показано, что клетки мутанта $\Delta waaC$ обладали высокой адгезией клеток и формированием биопленок на различных абиотических поверхностях. Также мутантный штамм характеризовался повышенной вирулентностью *in vitro*, в то время как *in vivo* клетки оказались не способны вызвать симптомы заболевания [26]. Необходимо также упомянуть о роли ЛПС в формировании биопленок у *Pseudomonas aeruginosa* [27].

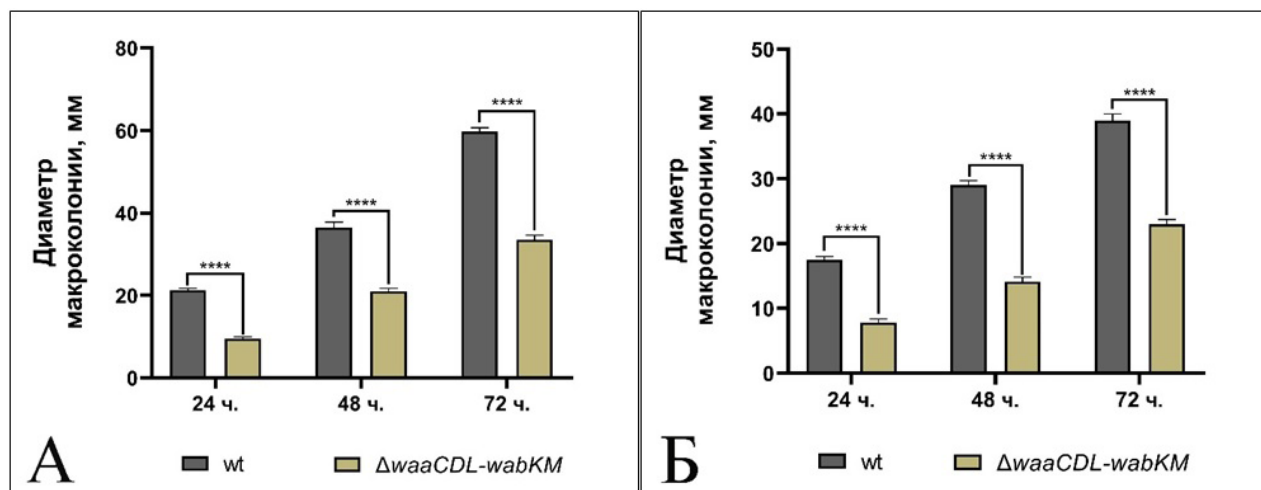


Рис. 4. Подвижность бактерий на полноценной среде (А) и минимальной среде M9 (Б). Уровень значимости P был рассчитан с использованием теста Уэлча (**** $P < 0,0001$)

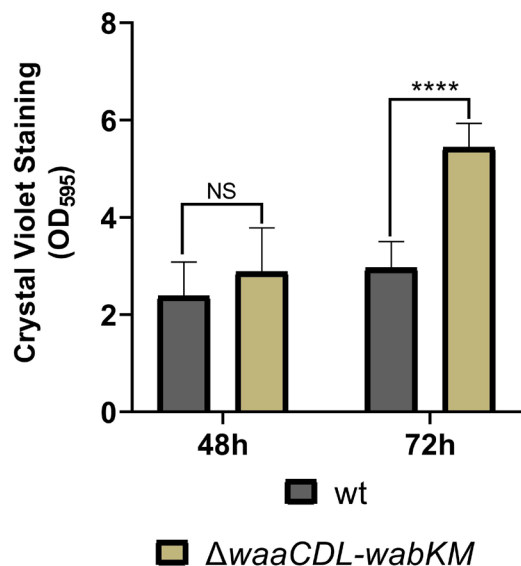


Рис. 5. Интенсивность формирования биопленок клетками штамма *E. amylovora* $\Delta waaCDL-wabKM$ и штаммом дикого типа (E2). Уровень значимости *P* был рассчитан с использованием теста Уэлча (NS — нет достоверных различий; *****P* < 0,0001)

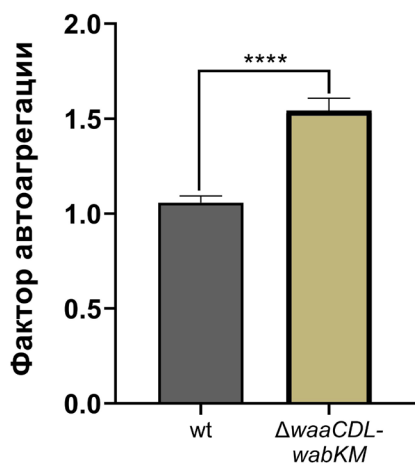


Рис. 6. Интенсивность автоагрегации клеток исследуемого штамма *E. amylovora* $\Delta waaCDL-wabKM$. Уровень значимости *P* был рассчитан с использованием теста Уэлча (*****P* < 0,0001)

Заключение

В ходе анализа геномной последовательности бактерии *Erwinia amylovora* E2 были выявлены и аннотированы гены биосинтеза липополисахаридов (*waaC*, *waaD*, *waaL*, *waaF*, *wabK*, *wabM*), потенциально связанные с патогенностью. Делеция генов *waaCDL-wabKM* привела к заметным изменениям в фенотипе бактерий *E. amylovora*. Клетки $\Delta waaCDL-wabKM$ обладали не только сниженной под-

вижностью и продукцией левана, но оказались авирулентными при искусственном заражении плодов груши. Изменение внешней мембраны также привело к повышению способности *E. amylovora* к формированию биопленок и автоагрегации. Липополисахариды фитопатогенных бактерий могут играть важную роль в супрессии защитного ответа растения на инфекцию, обеспечивать защиту клеток от антимикробных веществ и активных форм кислорода. Полученные нами данные указывают на важнейшую роль липополисахаридного слоя в вирулентности бактерий *E. amylovora*.

Список использованных источников

1. Castiblanco, L. F., Sundin, G. W. New insights on molecular regulation of biofilm formation in plant-associated bacteria // *Journal of Integrative Plant Biology*. – 2016. – Vol. 58, № 4. – P. 362–372.
2. Dufour, D. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance / D. Dufour, V. Leung, C.M. Lévesque // *Endodontic Topics*. - 2010. - Vol. 22, № 1. – P. 2–16.
3. Kharadi, R. R., Sundin, G.W. Dissecting the process of xylem colonization through biofilm formation in *Erwinia amylovora* // *Journal of Plant Pathology*. – 2020. – P. 1–9.
4. Садовская, О. В. Характеристика нового т-подобного бактериофага *Erwinia amylovora* / О. В. Садовская [и др.] // Доклады НАН Беларуси. – 2012. – Т. 56, № 3. – С. 83–87.
5. Enhanced Biofilm Formation by *Escherichia coli* LPS Mutants Defective in Hep Biosynthesis / R. Nakao [et al.] // *PLOS ONE*. – 2012. – Vol. 7, № 12. – P. 1–13.
6. Skurnik, M. *Yersinia enterocolitica* lipopolysaccharide: genetics and virulence / M. Skurnik, P. Toivanen // *Trends in Microbiology*. – 1993. – Vol. 1, № 4. – P. 148–152.
7. Modifications of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri Lipopolysaccharide Affect the Basal Response and the Virulence Process during Citrus Canker / S. Petrocelli [et al.] // *PLOS ONE*. – 2012. – Vol. 7, № 7. – P. 1–15.
8. Pier, G. B. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: a major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity / G.B. Pier // *International Journal of Medical Microbiology*. – 2007. - Vol. 297, № 5. – P. 277–295.

9. Marteyn, B. S. *Shigella*: a model of virulence regulation *in vivo* / B. S. Marteyn, A. D. Gazi, P. J. Sansonetti // Gut Microbes. – 2012. – Vol. 3, № 2. – P. 104–120.
10. Datsenko, K. A., Wanner, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products // PNAS. – 2000. – Vol. 97, № 12. – P. 6640–6645.
11. Zhao, Y. Construction and analysis of pathogenicity island deletion mutants of *Erwinia amylovora* / Y. Zhao, G. W. Sundin, D. Wang // Can. J. Microbiol. – 2009. – Vol. 55, № 4. – P. 457–464.
12. Wang, D. AmyR Is a Novel Negative Regulator of Amyovorin Production in *Erwinia amylovora* / D. Wang [et al.] // PLOS ONE. – 2012. – Vol. 7, № 7. – P. 1–11.
13. Castiblanco, L. F., Sundin, G.W. Cellulose production, activated by cyclic di-GMP through BcsA and BcsZ, is a virulence factor and an essential determinant of the three-dimensional architecture of biofilms formed by *Erwinia amylovora* Ea1189 / Molecular Plant Pathology. – 2018. – Vol. 19, № 1. – P. 90–103.
14. Kharadi, R. R., Sundin, G. W. Physiological and Microscopic Characterization of Cyclic-di-GMP-Mediated Autoaggregation in *Erwinia amylovora* // Frontiers in Microbiology. – 2019.
15. Molecular and structural basis of inner core lipopolysaccharide alterations in *Escherichia coli*: incorporation of glucuronic acid and phosphoethanolamine in the heptose region / G. Klein [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2013. – Vol. 288, № 12. – P. 8111–8127.
16. Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* / J. D. King [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2009. – Vol. 15, № 5. – P. 261–312.
17. Effect of a *waal* mutation on lipopolysaccharide composition, oxidative stress survival, and virulence in *Erwinia amylovora* / M. C. Berry [et al.] // FEMS Microbiology Letters. – 2009. – Vol. 291, № 1. – P. 80–87.
18. The Role of Bacterial Biofilms and Surface Components in Plant-Bacterial Associations / P. C. Bogino [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2013. – Vol. 14, № 8. – P. 15838–15859.
19. Contribution of *Erwinia amylovora* Exopolysaccharides Amyovorin and Levan to Biofilm Formation: Implications in Pathogenicity / J. M. Koczan [et al.] // Phytopathology. – 2009. – Vol. 99, № 11. – P. 1237–1244.
20. Genetics of Swarming Motility in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium: Critical Role for Lipopolysaccharide / A. Toguchi [et al.] // JOURNAL OF BACTERIOLOGY. – 2000. – Vol. 182, № 22. – P. 6308–6321.
21. Maldonado, R. F. Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection/ R. F. Maldonado, I. Sa-Correia, M. A. Valvano // FEMS Microbiology Letters. – 2016. – Vol. 40, № 4. – P. 480–493.
22. Truncation in the core oligosaccharide of lipopolysaccharide affects flagella-mediated motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 via modulation of cell surface attachment / T. Lindhout [et al.] // Microbiology. – 2009. – Vol. 155, № 10. – P. 3449–3460.
23. Extracellular Stress and Lipopolysaccharide Modulate *Acinetobacter baumannii* Surface-Associated Motility / C. N. McQueary [et al.] // The Journal of Microbiology. – 2012. – Vol. 50, № 3. – P. 434–443.
24. Influence of Core Oligosaccharide of Lipopolysaccharide to Outer Membrane Behavior of *Escherichia coli* / Z. Wang [et al.] // Marine Drugs. – 2015. – Vol. 13, № 6. – P. 3325–3339.
25. A Genome-wide Approach to Identify the Genes Involved in Biofilm Formation in *E. coli* / E. T. E. Niba [et al.] // DNA Research. – 2007. – Vol. 14, № 6. – P. 237–246.
26. Characterization of a biofilm-forming *Shigella flexneri* phenotype due to deficiency in Hep biosynthesis / D. Xu [et al.] // PeerJ. – 2016. – Vol. 14, № 4. – P. 1–19.
27. Expression of the lipopolysaccharide biosynthesis gene *lpxD* affects biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* / D. Xu [et al.] // Archives of Microbiology. – 2015. – Vol. 197, № 2. – P. 135–145.

К. Ю. Pesotskaya, A. L. Lagonenko, A. N. Evtushenkov

**PLEIOTROPIC EFFECT OF MUTATION IN THE GENES INVOLVED
IN THE BIOSYNTHESIS OF LIPOPOLYSACCHARIDES OF *ERWINIA
AMYLOVORA* PHYTOPATHOGENIC BACTERIA**

Belarusian State University
4 Nezavisimosty Ave., 220030 Minsk, Republic of Belarus
e-mail: lagonenkoal@mail.ru

In this study, we constructed *Erwinia amylovora* deletion mutant by *waaC*, *waaD*, *waaF*, *waaL*, *wabK* and *wabM* genes, coding enzymes involved in the synthesis of lipopolysaccharides of the bacteria outer membrane, and investigated the phenotypic manifestation of the resulting mutation. It was demonstrated that the resulting mutant has an increased ability to autoaggregation and biofilms formation, but is characterized by the reduced mobility and levan exopolysaccharide production. In addition, the deletion of genes of lipopolysaccharides biosynthesis led to the loss of the mutant strain virulence. The data obtained indicate the most important role the lipopolysaccharide layer plays in the virulence of *E. amylovora* bacteria.

Keywords: *Erwinia amylovora*, fire blight, biofilms, lipopolysaccharides, deletion mutant.

Дата поступления статьи: 23 февраля 2021 г.

В. Н. Кипень¹, М. В. Богданова¹, А. А. Буракова¹, О. И. Добыш¹, О. В. Зотова², Т. С. Королева²,
А. Г. Булгак², А. В. Байда³, С. А. Брускин⁴, В. А. Лемеш¹

ОБОСНОВАНИЕ МИНИМАЛЬНОГО ОБЪЕМА ВЫБОРКИ ДЛЯ ПРЕДСКАЗАНИЯ ХРОНОЛОГИЧЕСКОГО ВОЗРАСТА ЧЕЛОВЕКА

¹Государственное научное учреждение

«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»

Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

e-mail: v.kipen@igc.by

²Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр

«Кардиология» Министерства здравоохранения Республики Беларусь

Республика Беларусь, 220089, г. Минск, ул. Розы Люксембург, 110Б

³Государственное учреждение образования

«Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Республика Беларусь, 220013, г. Минск, ул. П. Бровки, 3, к. 3

⁴Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

«Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова Российской академии наук»

Российская Федерация, 117791, г. Москва, ул. Губкина, 3

На основании данных, представленных в открытом доступе на платформе GEO-NCBI для 21 проекта по определению полногеномного профиля метилирования ДНК с использованием Infinium Human Methylation 450K BeadChip (Illumina®), рассчитаны погрешность предсказания значений хронологического возраста в процентах и показатель MAD с использованием трех различных алгоритмов — линейной регрессии, обобщенно-регрессионных нейронных сетей и многослойных нейронных сетей прямого распространения. Для каждого алгоритма даны рекомендации по формированию выборок для исследования. Также показано, что минимальный и достаточный объем выборки, увеличение которого не приводит к значимому уменьшению значения MAD, составляет не менее 200 человек.

Ключевые слова: метилирование ДНК, кровь, определение возраста, HumanMethylation450 BeadChip, судебная эпигенетика.

Введение

Определение возраста индивида проводится по уровню метилирования ДНК (прижизненная химическая модификация CpG-динуклеотидов) с точностью 3–12 лет [1–14]. Биологический возраст, отражающий степень морфологического и физиологического развития организма, в контексте метилирования ДНК имеет тренд, как правило, максимально приближенный к линейному. Отклонения в изменении профиля метилирования от линейного тренда для биологического возраста, связанные с развитием и старением организма, наиболее выражены до 25 лет и после 60 лет. Именно в эти периоды наиболее существенны расхождения между хронологическим и биологическим возрастом. Кроме того, уровень метилирования конкретных CpG-динуклеотидов может разли-

чаться в зависимости от этногеографического происхождения индивидов [15].

Однако открытым остается вопрос о минимальном и достаточном количестве индивидов, включенных в исследование, необходимым для того, чтобы при разработке модели предсказания хронологического возраста человека достичь наилучшей точности предсказания, не усложнив при этом тест-систему. Это необходимо для того, чтобы стоимость данного анализа в рутинной криминалистической практике была сопоставима со стоимостью классического анализа по STR-профилированию (генетический паспорт для идентификации личности).

Цель исследования — оценить минимальный объем выборки для предсказания хронологического возраста человека на основании анализа

моделей, построенных для выборок с различным соотношением возрастных групп.

Материалы и методы

Формирование подгрупп с различным процентным соотношением значений хронологического возраста

Информация о хронологическом возрасте и уровне метилирования CpG-динуклеотидов представлена в открытом доступе (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Нами использованы данные 21 проекта: GSE32148, GSE40005, GSE40279, GSE42861, GSE51032, GSE53128, GSE52588, GSE50660, GSE53740, GSE53840, GSE60132, GSE61496, GSE55763, GSE59505, GSE67751, GSE69138, GSE74548, GSE77696, GSE106648, GSE115278, GSE125105. Образцы для каждой из выборок были произвольно отобраны из всего массива информации с использованием функции BERNULLI, реализованной в SPSS v.20.0 [16].

Каждая выборка формировалась с различным процентным соотношением возрастных групп «<40 лет», «≥40 и <60 лет», «≥60 лет» (рис. 1). В каждую из 11 выборок вошли по 800 человек, инкремент и декремент в соотношении возрастных групп между соседними выборками составил $5,98 \pm 3,51\%$. В выборках 1–3 преобладают образцы крайних возрастных групп — 40,60–47,81% из возрастной группы «<40 лет» и 39,97–46,87% из возрастной группы «≥60 лет».

В выборках 7–11 преобладают образцы из возрастной группы «≥40 и <60 лет» — 59,09–94,98%. Выборки 4–6 являются сбалансированными по соотношению возрастных групп «<40 лет», «≥40 и <60 лет», «≥60 лет».

Характеристика моделей предсказания хронологического возраста человека

Биоинформатический анализ проводился для 7 различных типов моделей: линейная регрессия — REG (анг. Regression); обобщенно-регрессионная нейронная сеть — GRNN (General Regression Neural Network); многослойная нейронная сеть прямого распространения — MLFN (Multilayered Feedforward Neural Network), с числом скрытых слоев от 2 до 6.

Линейная регрессия — метод предсказания зависимости одной (объясняемой, зависимой) переменной от другой или нескольких других переменных (факторов, независимых переменных). В статистике REG представляет собой метод аппроксимации зависимостей между входными и выходными переменными на основе линейной модели. Если анализируется зависимость между несколькими входными переменными и одной выходной переменной, то имеет место множественная линейная регрессия.

Обобщенно-регрессионная нейронная сеть (GRNN) имеет не только радиально-базисный слой с числом нейронов, равных числу элементов или менее обучающего множества, но включает и линейный слой. GRNN-сеть копи-

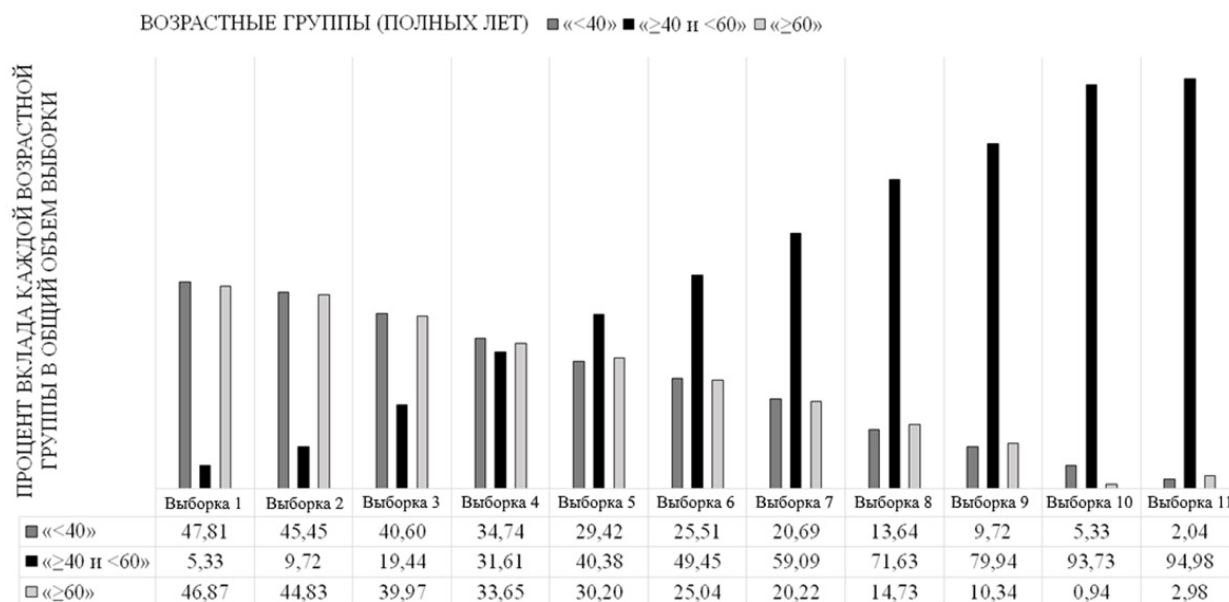


Рис. 1. Процент вклада каждой возрастной группы в общий объем выборки

рует внутрь себя все обучающие наблюдения и использует их для оценки отклика в произвольной точке. Окончательная выходная оценка сети резюмируется как взвешенное среднее выходов по всем обучающим наблюдениям, где величины весов отражают расстояние от этих наблюдений до той точки, в которой производится оценивание (и, таким образом, более близкие точки вносят больший вклад в оценку). Первый промежуточный слой сети GRNN состоит из радиальных элементов. Второй промежуточный слой (линейный) содержит элементы, которые помогают оценить взвешенное среднее. Как правило, в задачах регрессии требуется оценить одно выходное значение и, следовательно, второй промежуточный слой содержит два элемента [17].

Многослойная нейронная сеть прямого распространения (MLFN) — нейронная сеть, состоящая из входного, выходного и расположенного между ними одного или нескольких скрытых слоев нейронов.

Обучение нейронной сети — поиск такого набора весовых коэффициентов, при котором входной сигнал после прохода по сети преобразуется в выходной с наименьшей ошибкой. Обучающая выборка — конечный набор входных сигналов, по которым происходит обучение сети. Тестовая выборка — конечный набор входных сигналов, по которым происходит оценка качества работы сети [18].

Для всех моделей рассчитаны точность предсказания возраста, выраженная через MAD (Mean absolute deviation), и процент ошибки предсказания в диапазонах $\leq 1\%$, $\leq 5\%$, $\leq 10\%$, $\leq 20\%$ от истинного значения для двух наборов данных: «TRAINING SET» — массив для обучения модели (80% от объема выборки), «TESTING SET» — массив для тестирования точности модели (20% от объема выборки). Модель предсказания хронологического возраста REG реализована с использованием программы SPSS v.20.0. Модели предсказания хронологического возраста GRNN и MLFN реализованы с использованием программы NeuralTools PALISADE.

СрG-динуклеотиды для моделирования

Нами были проанализированы *in silico* данные для 10 СрG-динуклеотидов, прогностический потенциал которых подтвержден в исследовании [12]: cg02337583 (ген *ZC3H11A*), cg02872426 (ген *DDO*), cg06784991 (ген *ZYG11A*), cg06874016 (ген *NKIRAS2*), cg07553761 (ген *TRIM59*), cg11807280 (ген *MEIS1-AS3*), cg16054275 (ген *F5*), cg16867657 (ген *ELOVL2*), cg18473521 (ген *HOXC4*), cg25410668 (ген *RPA2*).

Результаты и обсуждение

Точность предсказания возраста в диапазонах $\leq 1\%$, $\leq 5\%$, $\leq 10\%$, $\leq 20\%$ от истинного значения для модели REG для каждой возрастной группы «<40 лет», « ≥ 40 и < 60 лет», « ≥ 60 лет» в пределах всех 11 выборок представлена на рисунке 2.

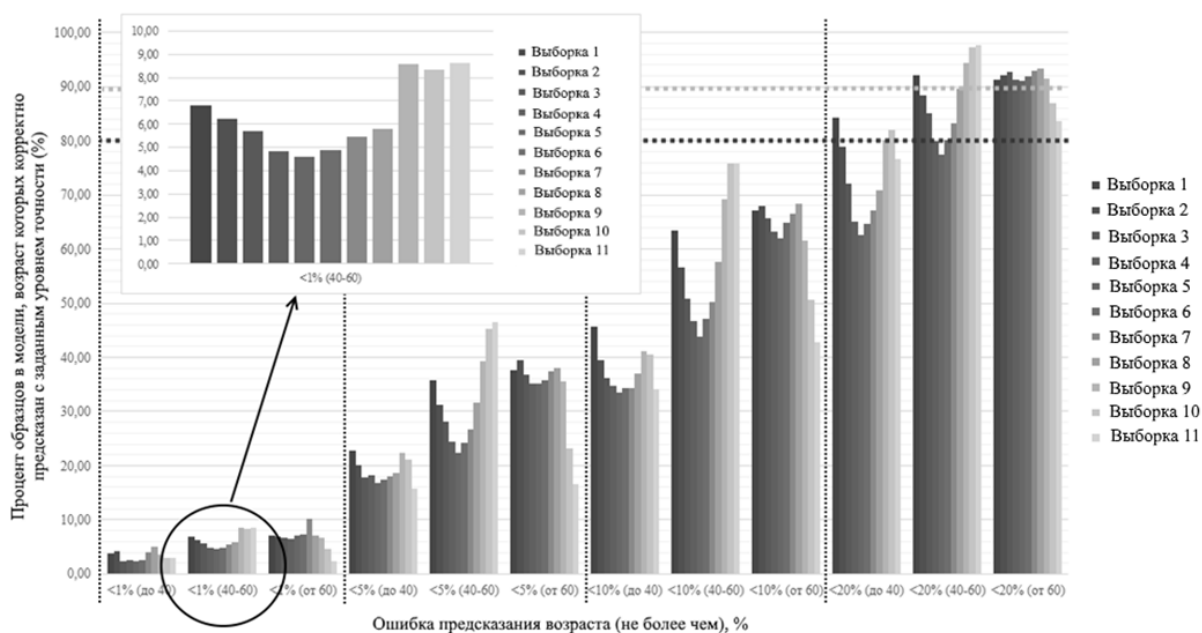


Рис. 2. Точность предсказания хронологического возраста (в %) с использованием REG

Из рисунка следует, что процент корректно предсказанных значений хронологического возраста наиболее высок для выборок 1, 2, 9–11. Изначально в модели принято решение использовать CpG-динуклеотиды с доказанной значительной линейной зависимостью от значения хронологического возраста человека ($R > 0,6$), что и отразилось на результатах модели REG. Так, для выборок 1–3 с максимальной представленностью возрастных групп «<40 лет» и «≥60 лет» точность предсказания оказалась одной из наибольших. Имеет место ситуация, когда две контрастно возрастные группы дают возможность весьма точно предсказать значения, расположенные между ними.

Точность предсказания в диапазонах ≤1%, ≤5%, ≤10%, ≤20% от истинного значения для модели, реализованной с использованием обобщенно-регрессионных нейронных сетей GRNN, для каждой возрастной группы «<40 лет», «≥40 и <60 лет», «≥60 лет» представлены на рисунке 3. Показано, что точность предсказанных значений хронологического возраста с использованием данного алгоритма выше, чем для REG.

Точность предсказания в диапазонах ≤1%, ≤5%, ≤10%, ≤20% от истинного значения для модели, реализованной с использованием многослойной нейронной сети прямого распространения MLFN (6 скрытых слоев), для каждой возрастной группы «<40 лет», «≥40 и

<60 лет», «≥60 лет» представлены на рисунке 4. Точность предсказанных значений хронологического возраста с использованием алгоритма MLFN сопоставима с GRNN.

Как видно из рисунков 2–4, количество ошибок предсказания ≤10% от истинного значения хронологического возраста минимально для модели с использованием алгоритма GRNN. Как правило, наибольшая точность характерна для выборок с контрастно-возрастными группами.

Использование в качестве критерия оценки точности предсказательной модели показателя MAD необходимо для сравнения нескольких моделей между собой. Значение MAD показывает, на сколько различаются предсказанное и истинное значения хронологического возраста. Из данных, представленных на рисунке 5, видно, что значение MAD для моделей по типу REG уменьшается в направлении от выборки 1 к выборке 11. Это объясняется тем фактом, что происходит относительное увеличение группы «≥40 и <60 лет» и одновременное уменьшение представленности групп «<40 лет» и «≥60 лет», т. е. уменьшается количество образцов из крайних групп, где дисперсия признака самая большая. Значения MAD для моделей по типу MLFN значимо не изменяются в пределах выборок 1–8 и начинают уменьшаться в пределах выборок 9–11. Наименьшие значения MAD показаны для моделей по типу GRNN.

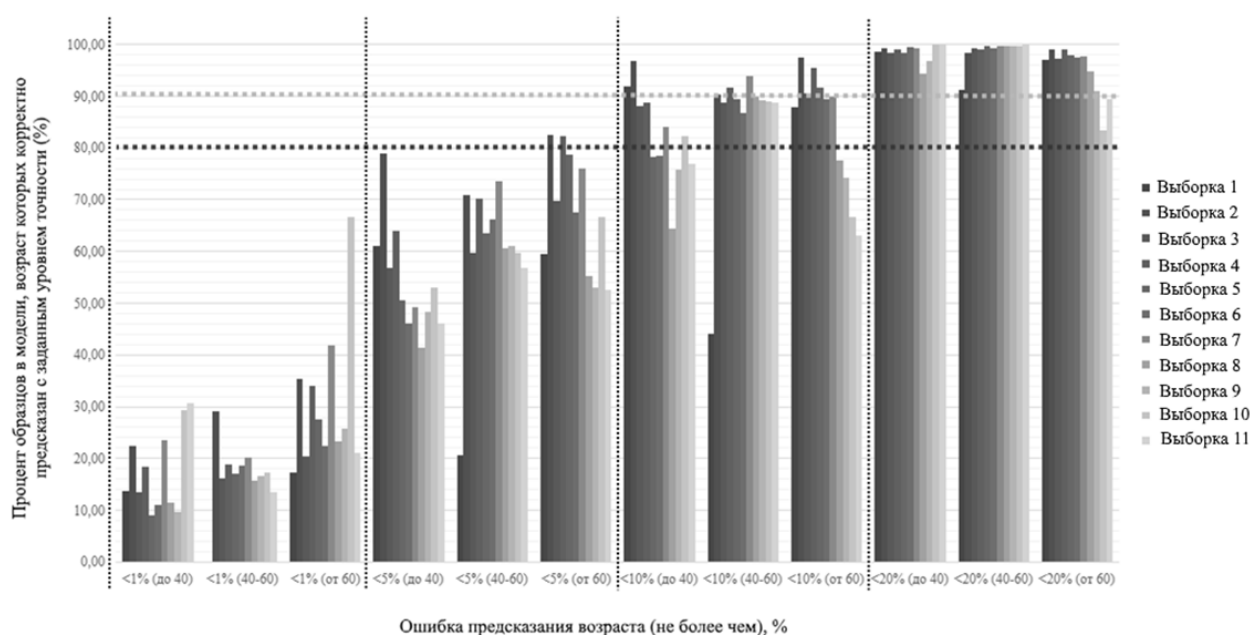


Рис. 3. Точность предсказания хронологического возраста (в %) с использованием алгоритма GRNN

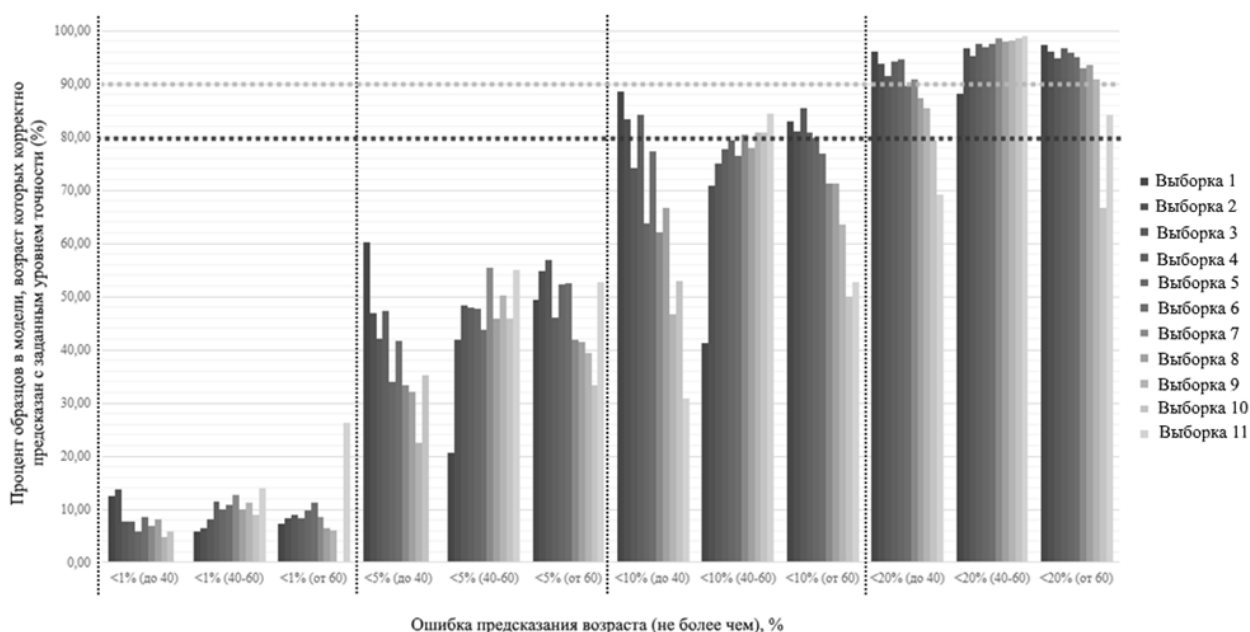


Рис. 4. Точность предсказания хронологического возраста (в %) с использованием MLFN (6 скрытых слоев)

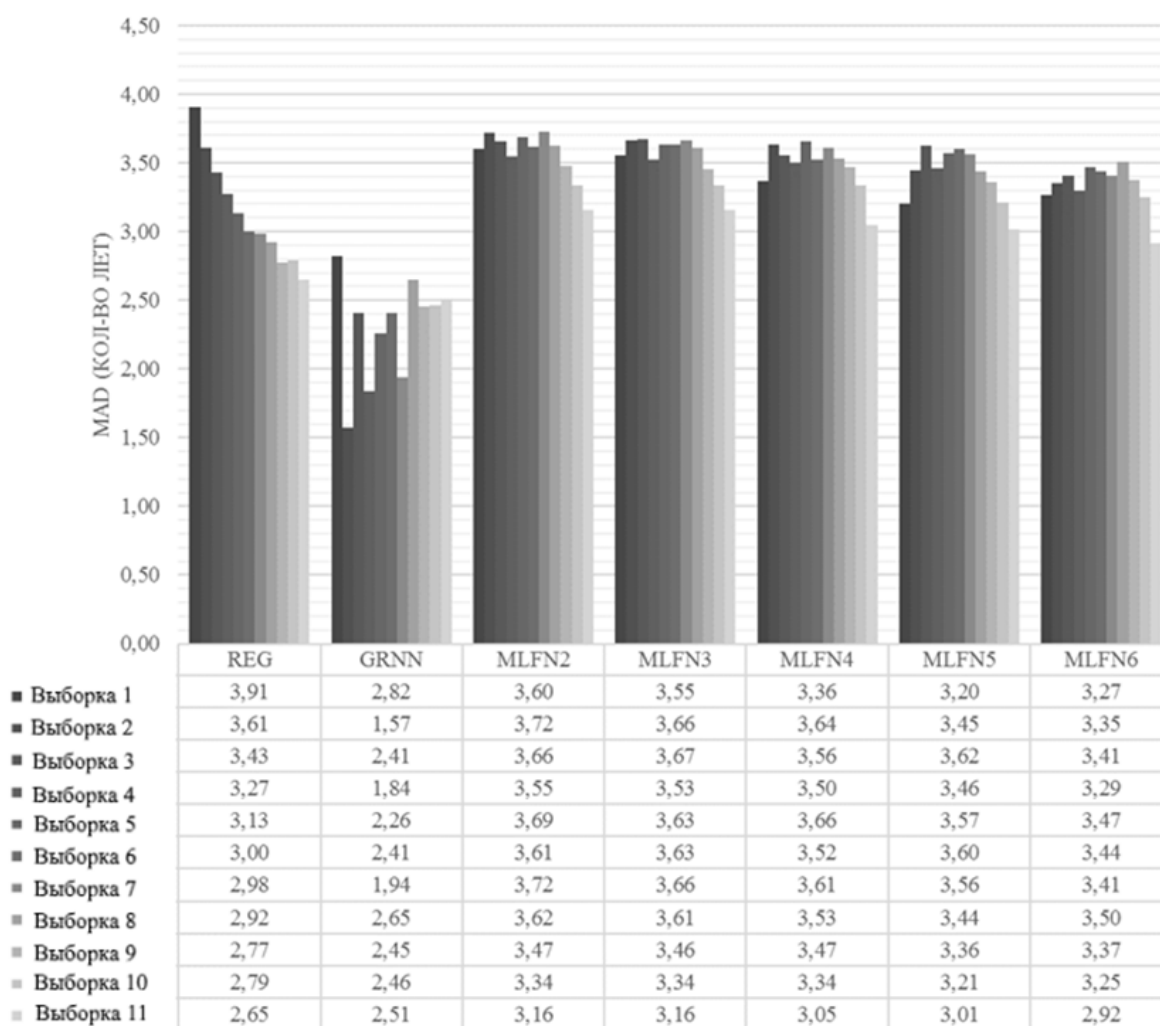


Рис. 5. Значения MAD для моделей предсказания хронологического возраста

На основании коэффициентов (для регрессии) и весов (для нейронных сетей), рассчитанных на этапе «TRAINING/TESTING», предсказан хронологический возраст для 3766 индивидов («VALIDATION SET»), ранее не входивших в TESTING SET и TRAINING SET. Предсказанные значения сравнили с истинными значениями возраста и выразили в процентах ошибку предсказания — до 10%, до 15% и до 20%.

По трем возрастным категориям наибольшая усредненная точность предсказания хронологического возраста на основании значений MAD показана для моделей REG (выборки 1, 9, 10 и 11), MLFN-2 (выборки 9 и 11), MLFN-6 (выборки 3 и 9). В то же время для моделей по типу MLFN наиболее сбалансированы по показателю MAD те выборки, в которых представленность каждой возрастной группы «<40 лет», «<40 лет и ≥60 лет» и «≥60 лет» сопоставима в процентах (рис. 1), т. е. выборки 6–8. Для моделей по типу REG наиболее сбалансированы по показателю MAD те выборки, в которых представленность возрастных групп «<40 лет» и «≥60 лет» максимальна, т. е. выборки 1 и 2. Для моделей по типу GRNN наиболее сбалансированы по показателю MAD также те выборки, в которых представленность возрастных групп «<40 лет» и «≥60 лет» оказалась максимальной — выборки 1–3.

Для определения минимального и достаточного количества индивидов в исследовании, способного решить задачу по определению хронологического возраста с уровнем точности MAD менее 4 лет, использована выборка 1. Именно в этой выборке были преимущественно представлены возрастные группы «<40 лет» и «≥60 лет» в процентах (рис. 1).

Для установления минимального объема выборки, достаточного для предсказания хронологического возраста, в рамках выборки 1 (N = 800) были сформированы 11 подвыборок с теми же показателями среднего значения возраста и стандартного отклонения данной переменной, содержащие от 60 до 800 человек («60P», «120P», «160P», «200P», «280P», «360P», «440P», «520P», «600P», «720P» и «800P»).

На рис. 6 представлена информация о проценте образцов в VALIDATION SET (n = 3766 человек), хронологический возраст которых корректно предсказан с уровнем точности от 10 до 20% с использованием 11 моделей REG, созданных на 11 подвыборках.

Как видно из результатов моделирования с использованием всех трех алгоритмов REG, GRNN и MLFN, при объеме выборке в 200–250 человек точность предсказания возраста статистически значимо не изменяется. Таким образом, в рамках данного моделирования

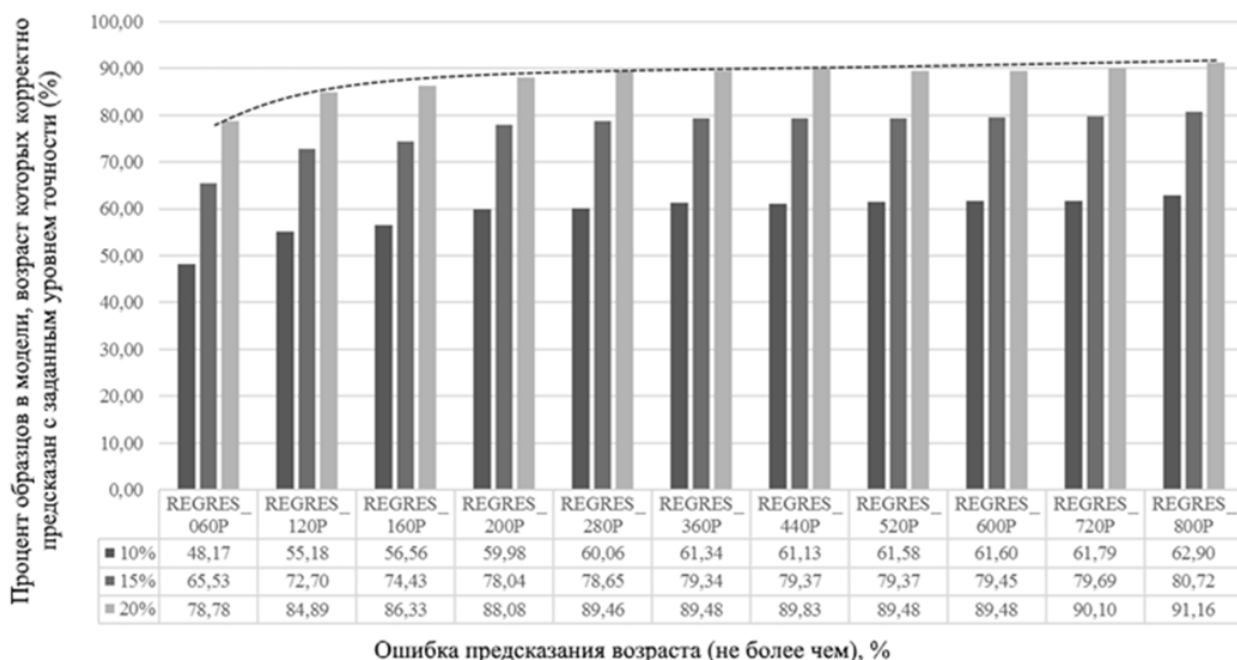


Рис. 6. Оценка точности предсказания хронологического возраста с использованием REG, расчеты приведены в отношении VALIDATION SET (n = 3766 человек)

минимальный и достаточный объем выборки — 200 человек. Модель, основанная на линейной регрессии, показала лучшие результаты, что может быть обусловлено, в первую очередь, тем фактом, что была использована информация о CpG-динуклеотидах со значительной линейной зависимостью от значения хронологического возраста человека ($R > 0,6$).

Из рисунка 7 видно, что при использовании линейной регрессии в качестве основного алгоритма предсказания хронологического возраста увеличение исследуемой выборки более 200 человек не приводит к значимому уменьшению значения MAD — происходит «насыщение» модели, и точность предсказания хронологического возраста значимо не увеличивается.

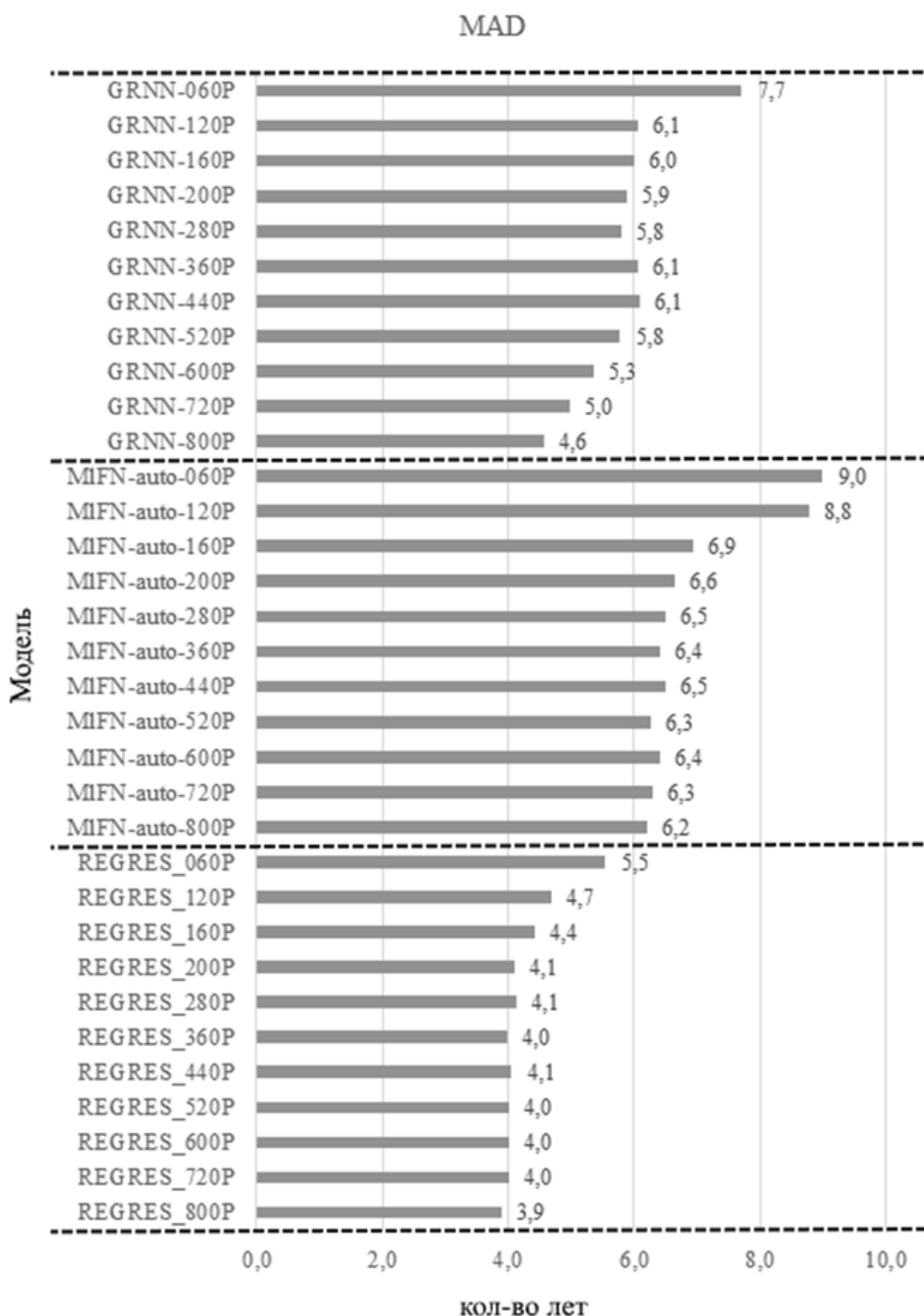


Рис. 7. Значения MAD (кол-во лет) для трех алгоритмов REG, GRNN и MLFN

Заключение

Таким образом, на основании оценки двух параметров: процент индивидов, для которых погрешность предсказания значений хронологического возраста меньше 10%, 15% и 20% от истинного значения, и показателя MAD, — для предсказания хронологического возраста с использованием трех различных алгоритмов REG, GRNN и MLFN имеются свои особенности.

Для регрессионных моделей (REG) для получения максимальной сбалансированности и точности рекомендуется уделить основное внимание формированию именно крайних возрастных групп — «<40 лет» и «≥60 лет», чтобы свести дисперсию переменной «Предсказанный возраст» к минимально приемлемой величине, т. е. минимизировать значение MAD для образцов в этих группах. Таким образом, рекомендуется исключить уже на этапе анализа предварительной версии модели предсказания хронологического возраста те образцы из групп «<40 лет» и «≥60 лет», для которых значение MAD больше двух стандартных отклонений.

Для моделей, построенных на архитектуре обобщенно-регрессионной нейронной сети (GRNN), для получения максимальной сбалансированности и точности рекомендуется уделить основное внимание формированию, в первую очередь, возрастных групп «<40 лет» и «≥60 лет», во-вторую, всех возрастных групп «<40 лет», «≥40 и <60 лет» и «≥60 лет» в сопоставимом объеме, что связано, в первую очередь, с природой нелинейных зависимостей при использовании данного алгоритма. В этом контексте GRNN модели занимают промежуточное положение между регрессионными моделями и моделями на архитектуре многослойной нейронной сети прямого распространения MLFN.

Для моделей MLFN для получения максимальной сбалансированности и точности рекомендуется уделить основное внимание формированию всех возрастных групп — «<40 лет», «≥40 и <60 лет» и «≥60 лет» — в сопоставимом объеме, по аналогичным для GRNN причинам. Разработка моделей предсказания хронологического возраста человека с использованием алгоритма MLFN весьма перспективна, т. к. позволяет учесть нелинейный характер взаимодействий предикторов и

зависимой переменной, особенно в периоды до 25 лет и после 60 лет.

Для моделей GRNN и MLFN рекомендуется исключить на этапе анализа предварительной версии модели предсказания хронологического возраста те образцы, для которых значение MAD больше трех стандартных отклонений.

Минимальный и достаточный объем выборки, увеличение которого не приводит к значимому уменьшению значения MAD по причине «насыщения» модели, составляет не менее 200 человек.

Работа выполнена в рамках научно-технической программы Союзного государства «Разработка инновационных геногеографических и геномных технологий идентификации личности и индивидуальных особенностей человека на основе изучения генофондов регионов Союзного государства» (ДНК-идентификация) мероприятия 2 «Разработка методики определения вероятного возраста индивида по характеристике его ДНК».

Список использованных источников

1. Bocklandt, S. Epigenetic predictor of age / S. Bocklandt [et al.] // PLoS One. – 2011. – Vol. 6. – P. e1–e6. doi: 10.1371/journal.pone.0014821
2. Koch, C. M. Epigenetic-aging-signature to determine age in different tissues / C. M. Koch, W. Wagner // Aging (Albany NY). – 2011. – Vol. 3. – P. 1018–1027. doi: 10.18632/aging.100395
3. Horvath, S. DNA methylation age of human tissues and cell types / S. Horvath // Genome Biology. – 2013. – Vol. 14. – P. e1–e19. doi: 10.1186/gb-2013-14-10-r115
4. Zbiec-Piekarska, R. Examination of DNA methylation status of the ELOVL2 marker may be useful for human age prediction in forensic science / R. Zbiec-Piekarska [et al.] // Forensic Science International: Genetics. – 2015. – Vol. 14. – P. 161–167. doi: 10.1016/j.fsigen.2014.10.002
5. Zbiec-Piekarska, R. Development of a forensically useful age prediction method based on DNA methylation analysis / R. Zbiec-Piekarska [et al.] // Forensic Science International: Genetics. – 2015. – Vol. 17. – P. 173–179. doi: 10.1016/j.fsigen.2015.05.001
6. Lee, H. Y. Genome-wide methylation profiling and a multiplex construction for the identi-

- fication of body fluids using epigenetic markers / H. Y. Lee [et al.] // *Forensic Science International: Genetics*. – 2015. – Vol. 17. – P. 17–24. doi: 10.1016/j.fsigen.2015.03.002
7. Park, J. L. Identification and evaluation of age-correlated DNA methylation markers for forensic use / J.L. Park [et al.] // *Forensic Science International: Genetics*. – 2016. – Vol. 23. – P. 64–70. doi: 10.1016/j.fsigen.2016.03.005
8. Freire-Aradas, A. Development of a methylation marker set for forensic age estimation using analysis of public methylation data and the Agena Bioscience EpiTYPER system / A. Freire-Aradas [et al.] // *Forensic Science International: Genetics*. – 2016. – Vol. 24. – P. 65–74. doi: 10.1016/j.fsigen.2016.06.005
9. Alghanim, N. Detection and evaluation of DNA methylation markers found at SCGN and KLF14 loci to estimate human age / H. Alghanim [et al.] // *Forensic Science International: Genetics*. – 2017. – Vol. 31. – P. 81–88. doi: 10.1016/j.fsigen.2017.07.011
10. Alsaleh, H. A multi-tissue age prediction model based on DNA methylation analysis / H. Alsaleh [et al.] // *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. – 2017. – Vol. 6. – P. 62–64. doi: 10.1016/j.fsigss.2017.09.056
11. Vidaki, A. DNA methylation-based forensic age prediction using artificial neural networks and next generation sequencing / A. Vidaki [et al.] // *Forensic Science International: Genetics*. – 2017. – Vol. 28. – P. 225–236. doi: 10.1016/j.fsigen.2017.02.009
12. Naue, J. Chronological age prediction based on DNA methylation: Massive parallel sequencing and random forest regression / J. Naue [et al.] // *Forensic Sci Int Genet*. – 2017. – Vol.31. – P.19–28. doi: 10.1016/j.fsigen.2017.07.015
13. Naue, J. Proof of concept study of age-dependent DNA methylation markers across different tissues by massive parallel sequencing / J. Naue [et al.] // *Forensic Sci Int Genet*. – 2018. – Vol. 36. – P.152–159. doi: 10.1016/j.fsigen.2018.07.007
14. Smeers, I. Evaluation of three statistical prediction models for forensic age prediction based on DNA methylation / I. Smeers [et al.] // *Forensic Science International: Genetics*. – 2018. – Vol. 34. – P. 128–133. doi: 10.1016/j.fsigen.2018.02.008
15. Fleckhaus, J. Impact of genetic ancestry on chronological age prediction using DNA methylation analysis / Fleckhaus J., Freire-Aradas A., Rothschild M.A., Schneider P.M. // *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 2017. Vol. 6. – P. e399-e400. doi: 10.1016/j.fsigss.2017.09.162
16. IBM Knowledge Center – Random variable functions [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.ibm.com/support/knowledgecenter/SSLVMB_27.0.0/statistics_reference_project_ddita/spss/base/randvarfunctionlist.html. – Дата доступа: 16.02.2021.
17. Филатова, Т. В. Применение нейронных сетей для аппроксимации данных / Т. В. Филатова // *Кибернетика*. – 2004. – Т. 1. – С. 121–125.
18. Николенко, С. И. Глубокое обучение. Погружение в мир нейронных сетей / С. И. Николенко, Е. В. Архангельская, А. Кадулин. – Санкт-Петербург: «Питер», 2020. – 476 с.

V. N. Kipen¹, M. V. Bahdanava¹, A. A. Burakova¹, O. I. Dobysh¹, O. V. Zotova^{1,2}, T. S. Koroleva²,
A. G. Bulgak², A. V. Baida³, S. A. Bruskin⁴, V. A. Lemesh¹

DETERMINATION OF MINIMUM SAMPLE SIZE FOR THE PREDICTION OF HUMAN CHRONOLOGICAL AGE

¹Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus
27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, Republic of Belarus
e-mail: v.kipen@igc.by

²Republican Scientific and Practical Centre “Cardiology”
of the Ministry of Health of the Republic of Belarus
110B Roza Lyuksemburg St., 220089 Minsk, Republic of Belarus

³Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education
3/3 P. Brovki St., 220013 Minsk, Republic of Belarus

⁴Vavilov Institute of General Genetics of the Russian Academy of Sciences
3 Gubkin St., 117791 Moscow, Russian Federation

Based on the data presented in the public domain on the GEO-NCBI Platform for 21 projects to determine the genome-wide DNA methylation profile using the Infinium Human Methylation 450K BeadChip (Illumina©), we calculated the prediction error for chronological age values in percentage terms and MAD using three different algorithms: linear regression, generalized regression neural networks and multilayer feedforward neural networks. For each algorithm, we have provided guidelines to select the samples for the study. We have also proved that the minimum and sufficient sample size, an increase in which does not lead to a significant decrease in the MAD value, is at least 200 people.

Keywords: DNA methylation, blood, age determination, genome-wide DNA methylation projects, HumanMethylation450 BeadChip, forensic epigenetics.

Дата поступления статьи: 17 февраля 2021 г.

А. Н. Хархаль, Л. П. Титов

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИИ МЕНИНГОКОККА В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В ДОВАКЦИНАЛЬНЫЙ ПЕРИОД

Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии

Республика Беларусь, 220114, Минск, Филимонова, 23

e-mail: anna-madlen69@yandex.by

Популяция менингококка, циркулирующая среди населения Республики Беларусь, в период (2006–2019 гг.) характеризуется динамичностью. Отмечено изменение серогрупповой структуры менингококка со снижением доли серогруппы А и негруппируемых штаммов; увеличением доли серогрупп В и Z. Наблюдалась элиминация менингококков серогруппы Е и появление серогруппы W. «Белорусские» менингококки входят в состав 13 известных клональных комплексов. Комплекс СС-103 представлен эндемическими сиквенс-типами и ассоциирован с серогруппами В и W; СС-41/44 равномерно включал серогруппы С и В. За вспышку менингококковой инфекции 2016–2018 гг., вызванную сиквенс-типом ST-11 MenW, ответственен СС-11. Комплекс СС-18 характеризовался распространением серогрупп В и С. Представленные в мировой популяции менингококка разнообразными серогруппами комплексы СС-53, СС-174 и СС-1136 на территории Беларуси ассоциировались с серогруппами В, С и А соответственно. Среди зарегистрированных в мире сиквенс-типов «белорусские» менингококки филогенетически представлены отдельным кластером.

Ключевые слова: менингококк, сиквенс-тип, клональный комплекс, серогруппа, молекулярное типирование, молекулярное биоразнообразие.

Введение

Менингококк — граммотрицательный кокк, способный вызывать различные формы инфекционных заболеваний, полиморфизм клинических проявлений которых, особенности течения и возможные осложнения остаются актуальными в современных условиях [1].

Во всем мире ежегодно регистрируется приблизительно 500 000 случаев генерализованной формы менингококковой инфекции. Случаи в основном вызваны менингококками серогрупп В и С [2], с повышением доли серогруппы W в структуре заболеваемости в 2013–2017 гг. в Европе [3]. Заболеваемость менингококковой инфекцией в Республике Беларусь за период 2006–2019 гг. составила 1,27 случаев на 100 тыс. населения. Минимальный и максимальный уровни различались в 4,8 раз (0,59 в 2016 г. против 2,84 в 2006 г.). Несмотря на низкую распространенность менингококковой инфекции в 2017–2019 гг. (средний показатель 0,63), частота ее проявления среди детей до 17 лет составляла 1,99–2,26 случаев на 100 тыс. населения, а в группе детей до 2 лет —

7,03–9,20. Стоит отметить 2016 г., который за наблюдаемый период характеризовался минимальным показателем заболеваемости (0,59 на 100 тыс. населения) и максимальным процентом летальности (13,1%).

Важным элементом мониторинга и контроля распространенности менингококковой инфекции является молекулярное ДНК-типирование, в рамках которого осуществляются серогенотипирование и мультилокусное сиквенс-типирование (MLST). В настоящее время серогенотипирование менингококка проводится путем детекции специфичных для отдельных серогрупп генов капсульного полисахарида в ДНК, выделенной из чистых культур или биологического материала, методом ПЦР. Капсулы неоднородны по химической и антигенной структуре и разделяют популяцию менингококка на 12 серогрупп (А, В, С, W, Y, E, H, I, K, L, X и Z), пять из которых (А, В, С, W и Y) ответственны за развитие большинства форм менингококковой инфекции [4]. Множественные генетические механизмы способствуют изменчивости экспрессии антигенов

менингококковой капсулы, однако большинство из них являются серогруппоспецифическими. Распространение серогрупп в популяции менингококков вариабельно в различных географических регионах, на что влияет как генетические механизмы возбудителя, так и вакцинация населения, что приводит к «появлению» или «исчезновению» некоторых серогрупп [5].

MLST менингококка основано на определении нуклеотидной последовательности 7 генов «домашнего хозяйства» (ГДХ), кодирующих цитоплазматические ферменты, экспрессируемые на всех стадиях клеточного цикла [6]. Метод является «золотым стандартом» изучения генетической структуры и эволюции возбудителей гнойного бактериального менингита, обладает высокой дискриминирующей способностью по сравнению с бактериологическими и серологическими методами и позволяет объединять результаты в общедоступную международную базу данных PubMLST (<https://pubmlst.org/neisseria>), что дает возможность сопоставлять данные, полученные исследователями из разных географических регионов и проводить оценку их эпидемического статуса [4, 7]. Этот метод типирования позволяет устанавливать связи инвазивных штаммов менингококка между собой, объединять их в клональные комплексы и в известные гиперинвазивные линии, независимо от географического положения [8]. В ряде стран MLST является обязательным компонентом национальной системы мониторинга за менингококковой инфекцией [9]. Каждой аллели присваивается номер, набор аллелей 7 генов образует аллельный профиль изолята, или сиквенс-тип (ST) [6]. Отмечена ассоциация наиболее распространенных ST с серогруппами: ST-5 и ST-7 — MenA; ST-41/44, ST-32, ST-18, ST-269, ST-8 и ST-35 — MenB; ST-11 — MenC или MenW; ST-23, ST-92 и ST-167 — MenY; и ST-181 — MenX [10]. Сиквенс-типы образуют клональные комплексы (CC), которые обуславливают заболеваемость на конкретной территории [1]. В клональный комплекс входят ST, для которых общими являются 4 и более аллелей ГДХ из 7 [11]. По состоянию на 12.02.2021 г., количество ST, входящих в широко распространенные CC, следующее: CC-41/44 (2 310 ST), CC-32 (787 ST),

CC-11 (502 ST), CC-213 (445 ST), CC-35 (368 ST), CC-18 (298 ST), CC-103 (190 ST), CC-53 (168 ST), CC-174 (116 ST), CC-346 (94 ST), CC-1136 (71 ST), CC-1 (63 ST), CC-92 (ST-49), CC-376 (41 ST).

Среди циркулирующих в мире менингококков описано 48 клональных комплексов. Большинство случаев менингококковой инфекции вызваны ограниченным числом гиперинвазивных клонов, которые, распространяясь в популяции человека, определяют частоту и цикличность эпидемического процесса [1]. Таким образом, заболеваемость генерализованной формой менингококковой инфекции, распределение серогрупп, сиквенс-типов и клональных комплексов являются в значительной степени региональными, что влияет на включение противоменингококковых вакцин в Национальный календарь профилактических прививок [12].

Цель настоящей работы — сравнительная характеристика генетической структуры (серогенотипы, сиквенс-типы) популяции менингококка, циркулировавшего в Республике Беларусь в период 2006–2019 гг.

Материалы и методы

Материалом для исследования явились 148 образцов ДНК, выделенных из биологического материала пациентов и чистых культур менингококка, которые поступили в Республиканскую референс-лабораторию по диагностике инвазивных бактериальных заболеваний (лаборатория клинической и экспериментальной микробиологии РНПЦ эпидемиологии и микробиологии) из учреждений здравоохранения страны за период февраль 2011 – июнь 2019 от пациентов с генерализованной формой менингококковой инфекции и бактерионосителей. Для определения изменчивости молекулярной структуры популяции менингококка на территории Республики Беларусь в период 2006–2019 гг. проводили сравнение полученных в 2011–2019 гг. данных [13, 14] с ранее опубликованными результатами за 2006–2010 гг. [15].

Выделение ДНК из культур менингококка выполняли по стандартной методике [16]. Экстракцию ДНК из образцов биологического материала (спинно-мозговая жидкость, плазма или сыворотка крови, цельная кровь,

замороженные ткани мозга, мозговых оболочек, селезенки, печени) производили коммерческими наборами QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Германия), innuPREP Blood DNA Mini Kit (analyticjena, Германия) и NucleoSpin® Blood MiniKit (Macherey-Nagel, Германия) согласно инструкциям производителя. Если культура менингококка утрачивала жизнеспособность в процессе транспортировки из баклабораторий республики, производилось выделение ДНК из питательной среды по протоколу из образцов биологического материала.

Определение серогрупповой принадлежности менингококка выполняли методом ПЦР в режиме реального времени и методом ПЦР с детекцией в агарозном геле. Гены-мишени, последовательности праймеров и зондов, использованных для серогенотипирования менингококка, а также температурно-временной режим использовали в соответствии с описанными ранее методиками [16, 17]. Амплификацию производили с помощью амплификатора Rotor Gene 3000 (Corbett Research, Австралия). Детекцию продуктов ПЦР осуществляли в 2% агарозном геле. При постановке каждой серии эксперимента дополнительно проводили реакции с отрицательным и положительным (ДНК, выделенной из штамма соответствующей серогруппы) контролями.

Для секвенирования генов домашнего хозяйства (ГДХ) менингококка использовали

праймеры, указанные в пособии по лабораторной диагностике бактериальных менингитов ВОЗ и CDC [16]. Допускалось использование праймеров для традиционной ПЦР в реакциях циклического секвенирования. Амплификацию фрагментов ДНК менингококка проводили на амплификаторе PCR Express (Hybaid, США) в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 0,25 мкл High Fidelity ДНК-полимеразы и 10 мкл 10x-буфера High Fidelity (Институт микробиологии НАН, РБ), праймеры в концентрациях 20 мкМ, 2 мкл исследуемой ДНК и необходимый объем воды для ПЦР. Модификация температурного режима, предложенного ВОЗ и CDC, позволила сократить время амплификации и возможность проведения ПЦР с разными генами за один раз (табл. 1). Допускалось применение температурно-временного режима ВОЗ и CDC для генов *pdhC* и *pgt* некоторых штаммов.

Детекцию продуктов ПЦР осуществляли в 2% агарозном геле. Целевые ДНК-фрагменты вырезали из геля и выделяли коммерческими наборами QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Германия) и «АртДНК MiniSpin Гель» (Артбиотех, РБ). Хранили при температуре –20 °С.

Реакцию циклического секвенирования ставили с использованием коммерческого набора BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) в соответствии с инструкцией производителя. Гель-электрофорез с детекцией нуклеотидной

Таблица 1

Сравнение рекомендуемого ВОЗ [16] и модифицированного температурно-временного режима для MLST менингококка

Рекомендации ВОЗ		Модификация
Гены <i>abcZ</i> , <i>adk</i> , <i>aroE</i> , <i>fumC</i> , <i>gdh</i> , <i>pdhC</i> <u>1 цикл:</u> 94 °С – 4 минуты; <u>35 циклов:</u> 94 °С – 1 минута, 55 °С – 1 минута, 72 °С – 1 минута; <u>1 цикл:</u> 72 °С – 5 минут, Хранение при 4 °С	Ген <i>pgt</i> <u>1 цикл:</u> 95 °С – 5 минут; <u>30 циклов:</u> 94 °С – 1 минута, 65 °С – 1 минута, 72 °С – 1 минута; <u>10 циклов:</u> 94 °С – 1 минута, 50 °С – 1 минута, 72 °С – 2 минуты; <u>1 цикл:</u> 72 °С – 5 минут, Хранение при 4 °С	Гены <i>abcZ</i> , <i>adk</i> , <i>aroE</i> , <i>fumC</i> , <i>gdh</i> , <i>pdhC</i> , <i>pgt</i> <u>1 цикл:</u> 94 °С – 4 минуты; <u>35 циклов:</u> 95 °С – 25 секунд, 62 °С – 35 секунд, 72 °С – 55 секунд, <u>1 цикл:</u> 72 °С – 1 минута, Хранение при 4 °С

последовательности проводили в генетических анализаторах ABI 3130 или ABI 3500 (Applied Biosystems, США). Качество прочтений оценивали в программе BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.5.3 [18]. Номер аллелей ГДХ определяли в базе PubMLST, используя опцию «Batch sequence query». После определения аллелей каждого из 7 генов [19] определяли ST и CC.

Для установления ассоциации клональных комплексов и серогрупп проводили анализ изолятов в базе данных pubMLST.org [20]. Филогенетический анализ изолятов менингококков выполняли методом Neighbor-Joining в программе MEGA X версии 10.0.5 [21]. Для определения последовательностей, эволюционирующих случайным или направленным образом, использовали статистический популяционно-генетический тест Таджиджи (D) [22]. При значении $D < 0$ предполагают, что последовательность ДНК эволюционировала случайным образом, а $D > 0$ говорит о вероятности направленного отбора. Для обоснования предположения о преимущественном направлении мутаций применяли алгоритм VVK CONSENSUS [23]. При значении общего GC $> 50\%$ предполагали преобладание GC-направленного мутационного давления; при значениях $< 50\%$ — AT-направленного мутационного давления.

Статистическую обработку данных проводили с помощью стандартных подходов статистики.

Результаты и обсуждение

Серогрупповая структура популяции менингококка

Возбудитель обладает кассетой генов, детерминирующих структуру капсульных антигенов и контролирующих механизмы их синтеза. Используя эти механизмы, менингококки способны избегать воздействия иммунного ответа, получая преимущества для выживания, способности распространяться и вызвать вспышку инфекции. Ранее на территории Республики Беларусь было проведено серогенотипирование изолятов менингококка, циркулировавших среди белорусской популяции [14, 15]. Данные о показателях заболеваемости и смертности в наблюдаемый период варьировали (табл. 2).

Многолетняя динамика заболеваемости менингококковой инфекцией за 22-летний период (1998–2019 гг.) характеризовалась умеренной тенденцией к снижению ($y = -0,1558x + 3,7017$), в то время как летальность росла ($y = 0,0579x + 8,5867$), что может быть обусловлено распространением в популяции гиперинвазивных штаммов, входящих в состав широко распространенных клональных комплексов. Пик заболеваемости в Республике Беларусь пришелся на 2000 г. (3,67 случаев на 100 тыс. населения), после которого наступил межэпидемический период. Серогенотипирование менингококка молекулярно-генетическим методом до 2006 г. в республике не проводилось. Сравнение частоты

Таблица 2

Характеристика заболеваемости и летальности от менингококковой инфекции в межэпидемический довакцинальный период (2006–2010 и 2011–2019 гг.)

Показатели	Межэпидемический довакцинальный период		
	2006–2010 гг.	2011–2019 гг.	1998–2019 гг.
Заболеваемость, показатель на 100 тыс. населения			
Среднеголетний показатель	2,06	0,84	1,91
Минимум	1,40 (2010 г.)	0,59 (2016 г.)	0,59 (2016 г.)
Максимум	2,84 (2006 г.)	1,32 (2011 г.)	3,67 (2000 г.)
Летальность, %			
Среднее значение	6,8%	10,5%	9,2%
Минимум	3,8% (2008 г.)	5,2% (2018 г.)	3,8% (2008 г.)
Максимум	10% (2009 г.)	13,1% (2016 г.)	13,1% (2016 г.)

выявления серогрупп менингококка в период 2006–2010 гг. и 2011–2019 гг. (рис. 1) позволило отметить изменение серогрупповой структуры возбудителя со снижением доли MenA и негруппируемых штаммов на 10% ($p < 0,001$); значительным увеличением доли MenB на 15% ($p < 0,001$) и незначительным увеличением доли MenZ ($p = 0,035$). Наблюдалась элиминация серогруппы MenE, циркулировавшей в 2006–2010 гг. (1,6%, $n = 10$), и появление MenW (10,1%, $n = 15$) с 2014 г. Статистически значимых различий в проявлении MenC и MenY в двух периодах не обнаружено ($p = 0,2$).

Среди инвазивных изолятов ($n = 563$) сохраняется тенденция к снижению доли MenA ($p < 0,001$) и негруппируемых штаммов ($p = 0,012$), увеличению доли MenB ($p = 0,005$) и MenW ($p < 0,001$). Среди неинвазивных изолятов ($n = 221$) доля MenW, MenZ ($p < 0,001$) и MenY ($p = 0,028$) увеличилась, а доля нетипируемых штаммов снизилась ($n = 0,013$).

На изменение серогрупповой структуры популяции менингококка на территории Республики Беларусь могло оказать применение мультивалентных конъюгированных вакцин против менингококка серогрупп А, С, Y, W (Россия, Польша, Украина, Латвия), серогруппы В (Литва). Несмотря на то, что в на-

стоящее время вакцина против менингококка серогруппы В зарегистрирована на территории нашей республики и доступна на платной основе с 2019 г., она не входит в Национальный календарь прививок. На изменение структуры заболеваемости, в том числе менингококковой инфекцией, могли повлиять схемы вакцинации населения против возбудителей острых респираторных инфекций. Так, охват вакцинации населения г. Минска против вируса гриппа за наблюдаемый период увеличился в 6,5 раз с 6,5% в 2006 г. до 42,1% в 2019 г. Установлено, что качественное и/или количественное изменение микробиоценоза верхних дыхательных путей человека создает предпосылки для развития различных патологических состояний [25]. Гриппозная инфекция способная подавлять иммунный ответ и барьерные функции слизистых оболочек, что способствует активации вегетирующих в дыхательном тракте возбудителей [24]. К тому же более 20% случаев ОРВИ вызывается смешанной вирус-вирусной и вирус-бактериальной инфекцией [24]. Самым частым бактериально ассоциированным осложнением ОРВИ у детей дошкольного уровня является острый средний отит. Вакцинация против гриппа детей до 5 лет также снижает частоту эпизодов острого среднего отита,

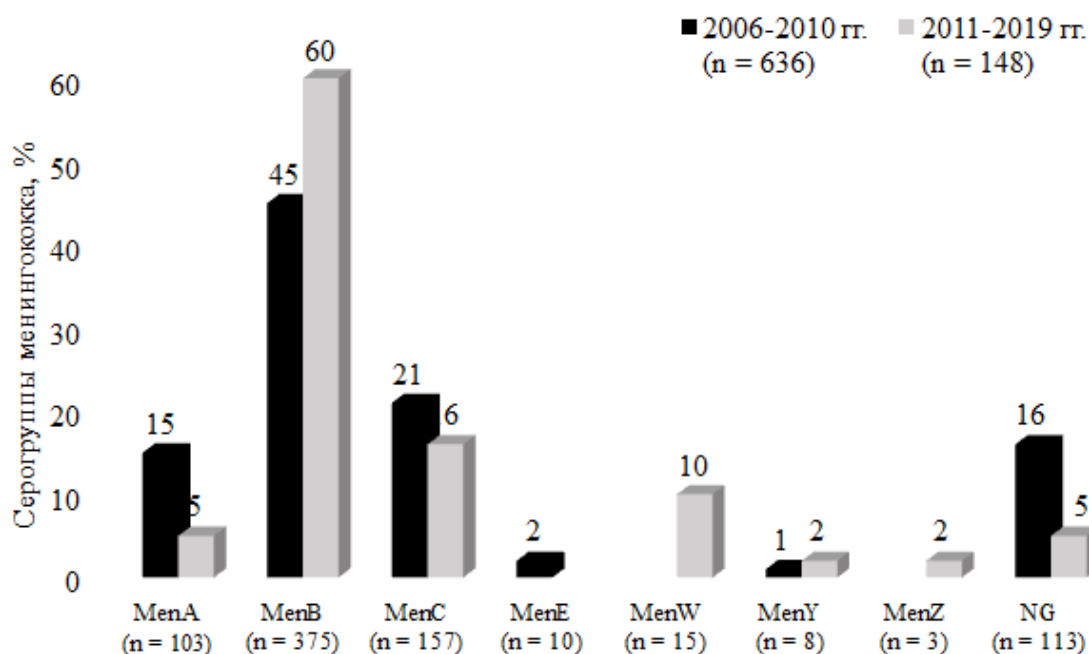


Рис. 1. Частота выявления серогрупп менингококка в межэпидемический довакцинальный период (2006–2019 гг.)

основными бактериальными возбудителями которого являются гемофильная палочка группы b и пневмококк [25]. Менингококк, пневмококк и гемофильная палочка, в свою очередь, являются основными возбудителями внебольничных случаев менингита и бактериемии.

Сиквенс-типовая структура популяции менингококка

Для проведения сиквенс-типирования менингококка были отобраны 60 изолятов, полученных из учреждений здравоохранения страны за период с февраля 2011 г. по май 2018 г. Изоляты были выделены из спинно-мозговой жидкости (n = 22), крови (n = 7), отделяемого носоглотки (n = 30), фрагментов головного мозга (n = 1) от пациентов и бактерионосителей из различных регионов Республики Беларусь. При исследовании изолятов было определено 17 аллелей гена *abcZ* (ABC-переносчик), 4 из которых встречались только среди инвазивных менингококков, и 5 — среди неинвазивных; 16 аллелей гена аденилатциклазы *adk* (6 инвазивных / 5 неинвазивных); 17 аллелей гена шикимат дегидрогеназы *aroE* (4 / 7); 24 аллели гена фумарат гидратазы *fumC* (6 / 8); 18 аллелей гена глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы *gdh* (3 / 7); 18 аллелей гена пирuvat дегидрогеназы *pdhC* (8 / 4); 20 аллелей гена фосфоглюкомутазы *pgm* (9 / 6).

В соответствии с тестом Таджimy (табл. 3) можно предположить, что 3 из 7 ГДХ (*aroE*,

gdh, *pdhC*) эволюционировали в рамках направленного отбора ($D > 0$), в то время как 4 из 7 (*abcZ*, *adk*, *fumC*, *pgm*) — случайным образом, т. е. содержат мутации, не влияющие на приспособленность и выживаемость организма. Для 6 из 7 ГДХ (кроме *abcZ*), которые кодируют ферменты метаболических путей, характерно мутационное GC-давление ($G+C$ и $3GC > 50\%$), т. е. повышение частоты возникновения замен АТ на GC относительно обратных им замен.

За 14-летний период наблюдений за сиквенс-типовой структурой популяции менингококка на территории Республики Беларусь зарегистрирован 71 сиквенс-тип (рис. 2). Идентифицированные сиквенс-типы встречались преимущественно спорадически (93%, n = 66). Почти половина выявленных ST (52,1%, n = 37) не входят в состав известных клональных комплексов (согласно pubMLST.org).

При проведении филогенетического анализа установлено, что менингококки CC-174, CC-213, CC-376 и не входящие в состав известных клональных комплексов ST-5810, ST-8271, ST-8735, ST-9985, ST-14249, ST-14250, ST-14281, ST-14326, ST-14328, ST-14412, образуют большой кластер, имеющий общего предка с менингококками CC-41/44 и некоторыми другими (рис. 2).

Ранее CC-11 был представлен единственным эндемичным клональным комплексом

Таблица 3

Характеристика аллелей ГДХ 60 изолятов менингококка (2011–2018 гг.)

Ген	Длина фрагмента, п. н.	Количество аллелей	Сайты ОНП	P_s^*	θ^{**}	π^{***}	D^{****}	Средний G+C, %	
								общий (G+C)	в 3-м положении (3GC)
<i>abcZ</i>	433	17	75	0,173	0,051	0,051	-0,041	50,8	46,7
<i>adk</i>	465	16	29	0,062	0,018	0,014	-1,156	52,5	57,5
<i>aroE</i>	490	17	125	0,255	0,075	0,082	0,394	55,5	54,7
<i>fumC</i>	465	24	37	0,080	0,021	0,021	-0,007	57,2	54,6
<i>gdh</i>	501	18	30	0,060	0,017	0,020	0,558	52,2	52,3
<i>pdhC</i>	480	18	80	0,167	0,048	0,062	1,163	55,6	55,6
<i>pgm</i>	450	20	67	0,149	0,042	0,042	-0,036	54,2	54,6

Примечание. * P_s = количество сайтов ОНП / количество нуклеотидов в последовательности, ** θ — частота мутаций, *** π — разница нуклеотидного состава на 1 сайт, **** D — статистический популяционно-генетический тест Таджimy

ST-8849 (2006 г.), но уже в 2016–2018 гг. вспышка менингококковой инфекции была вызвана ST-11. Следует отметить, что на территории республики встречалось около 0,4% сиквенс-типов CC-11, зарегистрированных в мире. Среди белорусской популяции менингококков наиболее близки к CC-11 сиквенс-типы ST-9447 и ST-8540, не входящие в состав клональных комплексов.

Менингококки CC-18 представлены пятью разными ST (1,7% от всех зарегистрированных сиквенс-типов CC-18), три из которых (ST-8545, ST-14280, ST-14673) являются эндемичными для Беларуси. У CC-18, CC-1, CC-1136, ST-14365, ST-14391, ST-14674 имеется общий предок.

Комплекс CC-103 на территории республики представлен наибольшим процентом ST от всех, зарегистрированных в мире (4,8%, n = 9). Данные сиквенс-типы являются эндемичными. Среди них только один (ST-9300) циркулировал на территории Брестской области и Минска в 2011–2016 гг.

Проведенный анализ позволил определить филогенетические связи «белорусских» эндемичных ST (n = 9) со всеми ST, входящими в CC-103 и зарегистрированными в мире (n = 187). ST-13861 наиболее близок к сиквенс-типам, характерным для стран Европы и Чили, имеет по 4 общих аллели с ST-3891 (Великобритания, 2000), ST-9226 (Чили), ST-12131 (Германия, 2014); по 3 общих аллели с ST-665 (Чехия, 1982) и ST-1269 (Великобритания, 1997). «Белорусский» ST-8576 (2006) наиболее близок с эндемичному для США (2002) ST-5848. Остальные «белорусские» эндемичные ST представляют отдельный кластер на филогенетическом дереве. Также у CC-103 и не входящего в состав CC ST-8852 имеется общий предок.

Один из наиболее многочисленных в мире по сиквенс-типовой структуре (n = 2 310) CC-41/44 на территории Республики Беларусь был представлен шестью ST, пять из которых эндемичны для страны, а один (ST-3346) циркулировал в 2011–2017 гг. в Минске и Могилеве.

На филогенетическом древе ST-9012 входит в кластер CC-41/44, однако не является членом клонального комплекса. Менингококки CC-41/44 и не входящие в известные клональные комплексы ST-8544, ST-14306, ST-14323 и ST-14390 имеют общего предка.

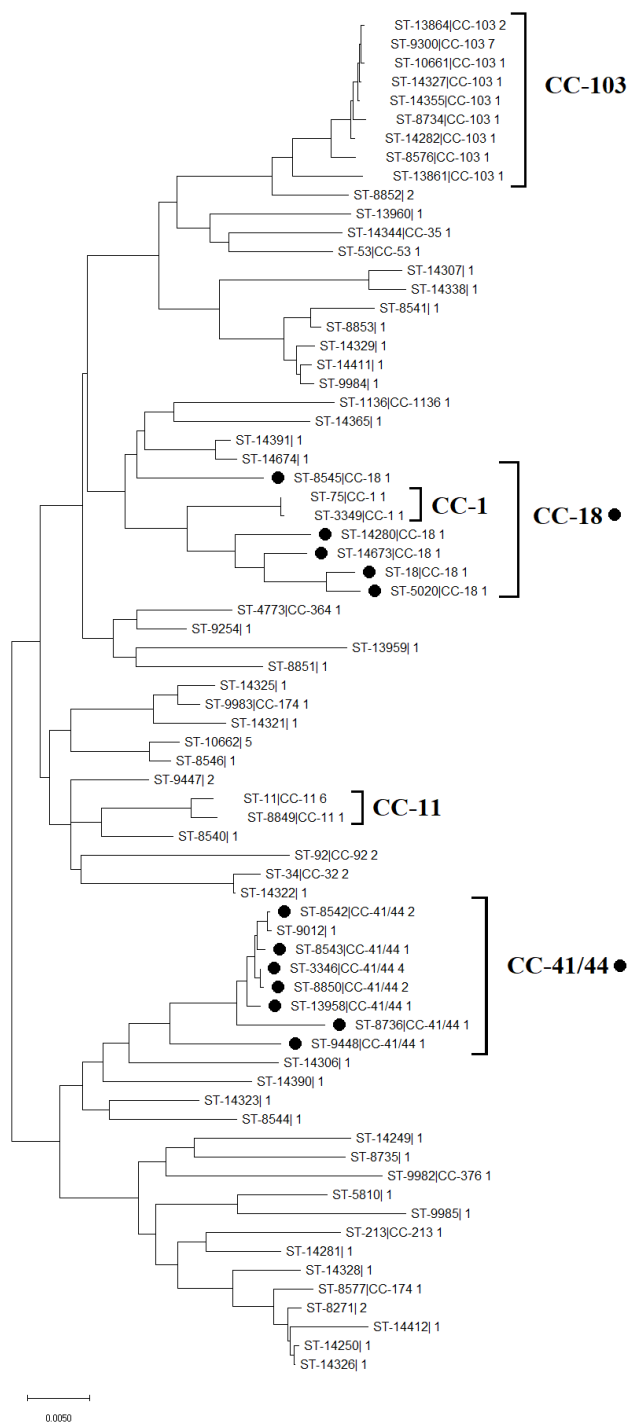


Рис. 2. Филогенетический анализ сиквенс-типов менингококка (n = 96), зарегистрированных на территории Республики Беларусь в межэпидемический период (2006–2018 гг.) методом Neighbor-Joining (MEGA X вер. 10.0.5)

Сиквенс-типы из других клональных комплексов регистрировались на территории Республики Беларусь спорадически (СС-1, СС-32, СС-35, СС-53, СС-174, СС-213, СС-364, СС-1136), за исключением ST-92 (СС-92), который выявлялся в 2013 и 2018 годах в Витебской области. Среди всех ST, не входящих в состав известных клональных комплексов, только ST-10662 (2,7%, n = 1) циркулировал на территории Минска и Гродненской области в 2011–2013 гг.

Исследование ассоциаций клональных комплексов и серогрупп позволило выявить совпадения как для белорусских менингококков, так и для мировой популяции: СС-1 — MenA; СС-32, СС-35, СС-213, СС-364 — MenB; СС-92 — MenY (табл. 4, рис. 3). Также наблюдаются общие тенденции в распределении ST, не входящих в состав известных клональных комплексов, между серогруппами.

СС-103, представленный эндемическими ST, ассоциирован с MenB (94,1%, n = 16) и

MenW (5,9%, n = 1), в то время как мировая популяция менингококков СС-103 разнообразна и представлена MenC (44,2%, n = 203), MenB (28,5%, n = 131), MenZ (15,5%, n = 71), MenY (10,9%, n = 50), MenW (0,7%, n = 1) и MenA (0,2%, n = 1). Таким образом, менингококки СС-103 MenW зарегистрированы только в Шотландии (1993), Беларуси (2014) и Испании (2018).

На территории нашей страны СС-41/44 был равномерно представлен MenC (58,3%, n = 7) и MenB (41,7%, n = 5), в то время как в мировой популяции менингококка отмечено преобладание MenB (95,1%, n = 7 986). Среди менингококков СС-41/44 встречаются также MenC (4,6%, n = 389), MenY (0,2%, n = 16), MenW (0,1%, n = 7) в Бразилии (1994) и странах Евросоюза (2000–2015 гг.), MenA (n = 3) в Нидерландах (1963), Буркина Фасо (2007) и Франции (2008), MenZ (n = 1) в Норвегии (1991).

Комплекс СС-11 в мире равномерно представлен MenC (47,8%, n = 3 925) и MenW

Таблица 4

Клональные комплексы и серогруппы менингококка, выделенных в Республике Беларусь от пациентов и бактерионосителей в межэпидемический довакцинальный период (n = 91, pubMLST.org)

Клональный комплекс	Серогруппы						Итого
	A	B	C	W	Y	Z	
СС-1	2	–	–	–	–	–	2
СС-11	–	1	–	6	–	–	7
СС-18	–	3	2	–	–	–	5
СС-32	–	2	–	–	–	–	2
СС-35	–	1	–	–	–	–	1
СС-41/44	–	5	7	–	–	–	12
СС-53	–	1	–	–	–	–	1
СС-92	–	–	–	–	2	–	2
СС-103	–	16	–	1	–	–	17
СС-174	–	–	1	–	–	–	1
СС-213	–	1	–	–	–	–	1
СС-364	–	1	–	–	–	–	1
СС-1136	1	–	–	–	–	–	1
Не СС	2	29	3	2	1	1	38
Итого:	5	60	13	9	3	1	91

(47,6%, n = 3 909), с небольшой долей MenB (4,2%, n = 347) и MenY (0,3%, n = 28) и единичными штаммами MenA (n = 2, Египет, Кыргызстан) и MenZ (n = 1, Шотландия). В Республике Беларусь доминировали CC-11 MenW (n = 6).

Среди CC-18 отмечено существенное преобладание MenB (95,1%, n = 520) над MenC (4,8%, n = 26), в то время как «белорусские» менингококки CC-18 характеризуются близким соотно-

шением MenB и MenC, что может быть связано с небольшим количеством изолятов.

В прочие CC (рис. 3) включены CC-37, CC-106, CC-116, CC-178, CC-181, CC-192, CC-198, CC-212, CC-226, CC-231, CC-254, CC-282, CC-292, CC-376, CC-549, CC-640, CC-750, CC-1117, CC-1157, CC-1494, CC-1572, CC-4240/6688 и CC-10217, которые не были зарегистрированы на территории Республики Беларусь и представлены небольшим количеством изолятов.

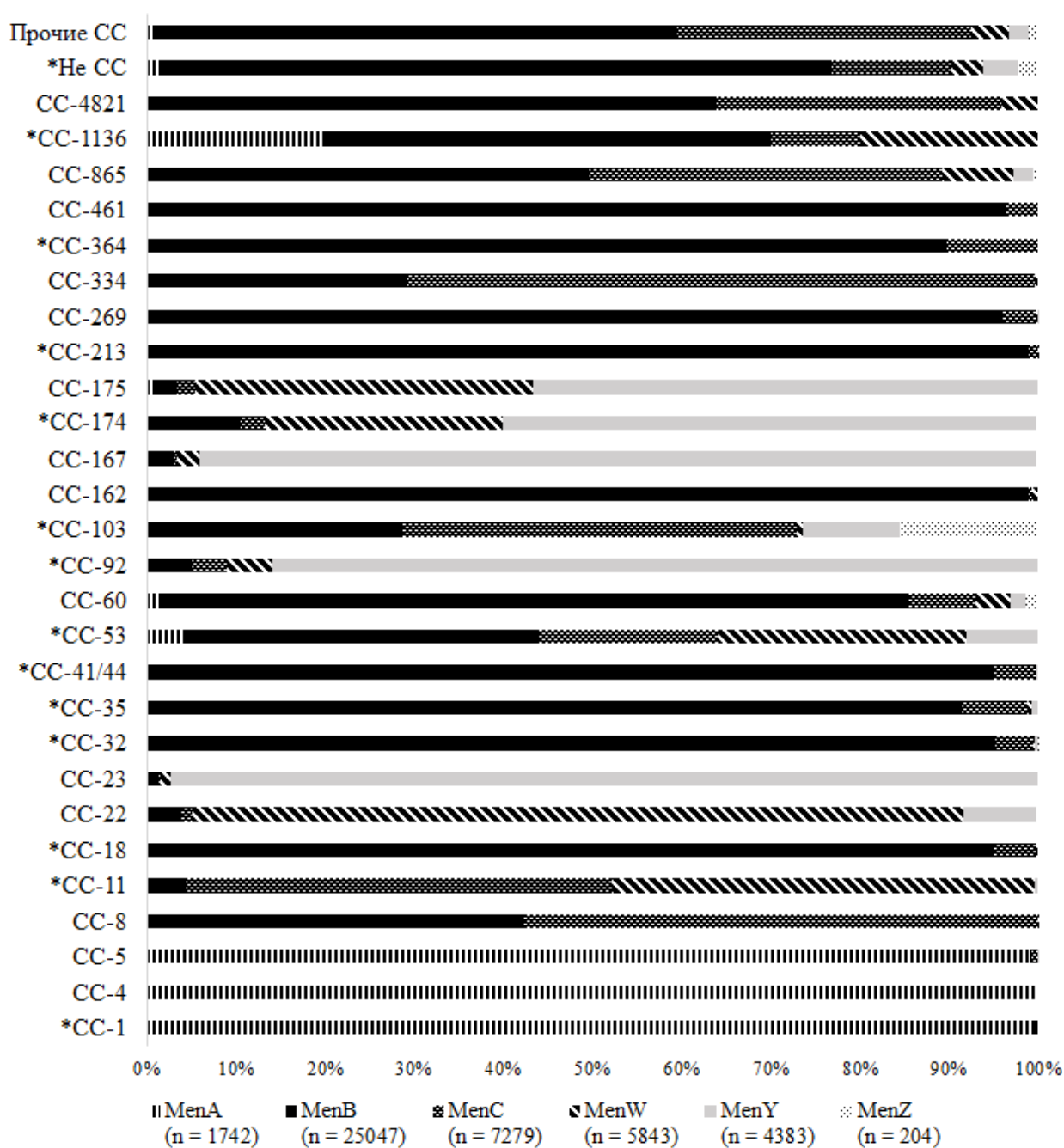


Рис. 3. Ассоциация клональных комплексов и серогрупп менингококка, зарегистрированных в мире (n = 44 498, pubMLST.org), * отмечены CC, циркулирующие на территории Республики Беларусь

Заключение

Заболееваемость менингококковой инфекцией в период 1998–2019 гг. в Беларуси характеризуется цикличностью. С 2000 г. проходит межэпидемический период, в котором заболеваемость падает, а летальность колеблется в пределах 10%, что связано с генетической структурой популяции возбудителя. Менингококки, циркулировавшие среди населения республики, характеризовались разнообразием как на серогрупповом, так и сиквенс-типовом уровнях.

Отмечено изменение структуры менингококка со снижением доли серогруппы А и негруппируемых штаммов; увеличением доли серогрупп В и Z. Наблюдалась элиминация менингококков серогруппы Е и появление серогруппы W. Статистически значимых различий во встречаемости серогрупп С и Y не обнаружено. Некоторые ГДХ (*aroE*, *gdh*, *pdhC*) эволюционировали в рамках направленного отбора, а оставшиеся (*abcZ*, *adk*, *fumC*, *pgm*) — случайным образом.

За 14-летний период наблюдений зарегистрирован 71 сиквенс-тип, 47,9% которых входят в состав 13 известных клональных комплексов. Более половины выявленных сиквенс-типов (52,1%, $n = 37$) не являются членами клональных комплексов. Циркуляция высокоинвазивного ST-11 (CC-11) приходилась на 2016–2018 гг., что отразилось в высоком уровне летальности в 2016 г. на фоне минимального уровня заболеваемости за 22-летний период (1998–2019 гг.).

Список использованных источников

1. Титов, Л. П. Менингококковая инфекция: современное состояние проблемы / Л. П. Титов // *Здравоохранение*. – 2010. – № 12. – С. 15–23.
2. A Cluster of Meningococcal Disease Caused by Rifampicin-Resistant C Meningococci in France, April 2012 / I.M. Njoya [et al.] // *Euro Surveill*. – 2012. – Vol. 17, № 34. – P. 20254.
3. Increase of invasive meningococcal serogroup W disease in Europe, 2013 to 2017 / M. Krone [et al.] // *Euro Surveill*. – 2019. – Vol. 24, № 14. – P. 1–9.
4. The Global Meningococcal Initiative: global epidemiology, the impact of vaccines on meningo-

coccal disease and the importance of herd protection / R. Borrow [et al.] // *Expert Rev Vaccines*. – 2017. – Vol. 16, № 4. – P. 313–328.

5. Differences in the population structure of *Neisseria meningitidis* in two Australian states: Victoria and Western Australia / S. Mowlaboccus [et al.] // *PLoS One*. – 2017. – Vol. 12, № 10. – P. 1–16.

6. *Neisseria* Sequence Typing Home Page [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://pubmlst.org/neisseria/>. – Дата доступа: 21.11.2018.

7. Rodrigues, C. M. C. A world without bacterial meningitis: how genomic epidemiology can inform vaccination strategy / C. M. C. Rodrigues, M. C. J. Maiden // *F1000Res*. – 2018. – Vol. 7. – P. 401–414.

8. Changes in the population structure of invasive *Neisseria meningitidis* in the United States after quadrivalent meningococcal conjugate vaccine licensure / X. Wang [et al.] // *J Infect Dis*. – 2015. – Vol. 211, № 12. – P. 1887–1894.

9. Молекулярно-биологический мониторинг возбудителей гнойного бактериального менингита на современном этапе / С. В. Матосова [и др.] // *Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение*. – 2018. – Т. 7, № 1. – С. 93–99.

10. Crum-Cianflone, N. Meningococcal Vaccinations / N. Crum-Cianflone, E. Sullivan // *Infect Dis Ther*. – 2016. – Vol. 5, № 2. – P. 89–112.

11. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms / M. C. Maiden [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1998. – Vol. 95, № 6. – P. 3140–3145.

12. Нехаев, С. Г. Клинический случай бактериального менингита / С. Г. Нехаев, Л. Г. Ястребова, В. И. Шитикова // *Вестник новых медицинских технологий*. – 2019. – Т. 13, № 2. – С. 91–94.

13. Хархаль, А. Н. Молекулярно-генетическая характеристика возбудителя менингококковой инфекции в Беларуси: сиквенс-типы и клональные комплексы / А. Н. Хархаль, Л. П. Титов // *Здравоохранение*. – 2020. – № 7. – С. 33–44.

14. Хархаль, А. Н. Серогрупповая структура *Neisseria meningitidis*, циркулировавших на

- территории Республики Беларусь в довакцинальный период (2011–2019) / А. Н. Хархаль, Л. П. Титов // *Здравоохранение*. – 2020. – № 6. – С. 11–18.
15. Молекулярно-генетический мониторинг *Neisseria meningitidis* на территории Республики Беларусь (2006–2010 гг.) / С. Э. Глазкова [и др.] // *Здравоохранение (Минск)*. – 2011. – № 11. – С. 10–14.
16. Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. – Pub. 2. – Geneva : WHO Press, 2011. – 311 p.
17. Development of a multiplex PCR assay for detection and genogrouping of *Neisseria meningitidis* / H. Zhu [et al.] // *J Clin Microbiol*. – 2012. – Vol. 50, № 1. – P. 46–51.
18. Hall, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT / T. A. Hall // *Nucleic acids symposium series* / [London]: Information Retrieval Ltd. – 1999. – Vol. 41. – P. 95–98.
20. *Neisseria* PubMLST [Electronic resource]. – Mode of access: https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst_neisseria_isolates. – Date of access: 31.05.2020.
21. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms / S. Kumar [et al.] // *Mol Biol Evol*. – 2018. – Vol. 35, № 6. – P. 1547–1549.
22. Tajima, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. / F. Tajima // *Genetics*. – 1989. – Т. 123, № 3. – С. 585–595.
23. Khrustalev, V. V. HIV1 V3 loop hypermutability is enhanced by the guanine usage bias in the part of env gene coding for it / V. V. Khrustalev // *In silico biology*. – 2009. – Т. 9, № 4. – С. 255–269.
24. Вакцинация против гриппа, пневмококковой, менингококковой и Hib-инфекции часто болеющих детей / Л. С. Намазова [и др.] // *Педиатрическая фармакология*. – 2007. – Т. 4, № 1. – С. 67–81.
25. Карпова, Е. П. Иммунопрофилактика инфекций верхнего отдела респираторного тракта у часто болеющих детей / Е. П. Карпова, А. Л. Заплатников, Д. А. Тулупов // *Вестник оториноларингологии*. – 2015. – Т. 80, № 5. – С. 80–84.

H. N. Kharkhal, L. P. Titov

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE GENETIC STRUCTURE OF THE MENINGOCOCCAL POPULATION IN THE REPUBLIC OF BELARUS IN THE PREVACCINAL PERIOD

Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology
of the Republic of Belarus
23 Filimonov St., 220114 Minsk, Republic of Belarus
e-mail: anna-madlen69@yandex.by

Meningococci circulating among the population of the Republic of Belarus during the observed pre-vaccination interepidemic period (2006–2019) is characterized by dynamism. A change in the serogroup structure was noted with a decrease of meningococci serogroup A and non-grouped strains; an increase of meningococci serogroups B and Z. Elimination of MenE and the emergence of MenW were observed. “Belarusian” meningococci are part of 13 known clonal complexes. CC-103 is represented by endemic ST and is associated with MenB and MenW; CC-41/44 evenly included serogroups B and C. CC-11 is responsible for the outbreak of meningococcal infection in 2016–2018 caused by ST-11 MenW. CC-18 was characterized by the proliferation of serogroups B and C. Clonal complexes CC-53, CC-174 and CC-1136 represented by various meningococcal serogroups in the world population were associated in the territory of Belarus with MenB, MenC and MenA respectively. Among the ST CC-103 and CC-41/44 registered in the world, “Belarusian” meningococci are phylogenetically represented as a separate cluster.

Keywords: meningococcus, sequence-type, clonal complex, serogroup, molecular typing, molecular biodiversity.

Дата поступления статьи: 24 февраля 2021 г.

Е. Л. Романишко, М. Е. Михайлова, Р. И. Шейко

ВЫЯВЛЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМОВ 1843С>Т В ГЕНЕ *RYR1* И 5860С>Т В ГЕНЕ *DMD*, АССОЦИИРОВАННЫХ СО СТРЕССОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ СВИНЕЙ, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ KASP

Государственное научное учреждение
«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27
e-mail: lenaramanishko@mail.ru

Подверженность свиней стрессам представляет для свиноводства серьезную экономическую проблему. Методом конкурентной аллель-специфической ПЦР (KASP) исследованы генетические факторы, обуславливающие чувствительность свиней к стрессу, такие как полиморфизмы 1843С>Т в гене *RYR1* (rs344435545) и 5860С>Т в гене *DMD* (rs196952080) у пород, разводимых в Республике Беларусь. Частота встречаемости животных-носителей стресс-синдрома, ассоциированного с полиморфизмом гена *DMD* (генотип ТО/ТТ), составила в породе ландрас 2,8%. Мутантный аллель Т выявлен в выборке животных породы ландрас с частотой — 14,2%, дюрок — 1,3%, йоркшир — 0,8%. Мутантных аллелей п в гене *RYR1* в исследованной выборке животных не выявлено. Результаты исследований показывают, что для контроля и элиминации проявления стресс-синдрома в популяции необходимо проведение ДНК-диагностики племенных животных по выявлению несинонимичных замен в генах *RYR1* и *DMD*.

Ключевые слова: свиноводство, генетические дефекты, ДНК-тестирование KASP, *RYR1*, *DMD*, стресс-синдром.

Введение

Современная технология содержания свиней в крупных промышленных комплексах значительно отличается от естественных условий обитания животных. Комплексные зоотехнические и ветеринарные мероприятия, а также шум, скученность, замкнутое пространство становятся источниками сильного стресса у животных. Под влиянием стресса у свиней снижаются масса тела, воспроизводительные качества, увеличивается восприимчивость к инфекциям. Такие животные более требовательны к содержанию и кормлению. Поведенческая и физиологическая реакция организма на стресс получила название стресс-синдрома (PSS, porcine stress syndrome).

Характерные особенности свиней, подверженных PSS-синдрому, — повышенная возбудимость, гормональные расстройства, изменения в сердечно-сосудистой системе, нарушение теплообмена, из-за чего стрессочувствительные свиньи страдают от перегрева, что приводит к синдрому злокачественной гипертермии —

MHS (Malignant hypertermia syndrome). Ускоренный метаболизм и анаэробный гликолиз в скелетных мышцах приводят к образованию избыточного количества молочной кислоты, с утилизацией которой организму животного трудно справиться. Высокая концентрация молочной кислоты и высокая температура тела является причиной смерти чувствительных к стрессу животных, а также вызывают биохимические изменения в скелетной мускулатуре таких животных, у которых после убоя патологически бледная, водянистая и мягкая свинина с кислым вкусом — PSE (pale, soft, exudative) [1–4].

Длительная односторонняя селекция свиней на улучшение постности мяса привела к тому, что ряд высокопродуктивных мясных пород, таких как ландрас, пьетрен, гемпшир и йоркшир имеют повышенную чувствительность к стрессам. В исследовании Fujii J. с соавторами был описан однонуклеотидный полиморфизм 1843С>Т (rs344435545) в 17 экзоне гена рецептора рианодина (*RYR1*), ассоциированный со стрессочувствительностью свиней [5].

Ген рецептора рианоцина кодирует экспрессирующийся в скелетных мышцах белок кальциевого канала. Замена цитозина на тимин приводит к аминокислотной замене аргинина на цистеин в кодоне 615 (R615C), в результате чего нарушается структура одного из ферментов кальциевого канала и, как следствие, изменяется ход обменных процессов кальция в скелетных мышцах. У гомозиготных животных с генотипом pp наблюдается так называемый индуцируемый стрессом синдром злокачественной гипертермии — MHS [5, 6]. До 12% исследованных животных с генотипом pp умирают от PSS и до 50% — имеют порок PSE [7]. Поскольку полиморфизм 1843C>T ассоциирован с высоким содержанием более постного мяса в туше, интенсивная селекция на мясность привела к тому, что частота встречаемости этой мутации в популяциях свиней значительно выросла. Так, частота мутантного аллеля p в зависимости от породы составляла: в Канаде до 8,6% [7], в Румынии до 9,4% [8], в Словении до 21,4% [9], в России — 1,3% [10]. Животные с высоким содержанием мяса часто характеризуются низкой устойчивостью к стрессу, следствием чего является ухудшение качества свинины, замедление роста поросят, снижение репродуктивных показателей и иммунного статуса животных. Однако объяснить все случаи PSS с помощью только одного полиморфизма в гене *RYR1* не удалось, поэтому поиски других полиморфизмов в геноме свиней продолжили.

Так, Nonneman Dan J. с соавторами описали мутацию 5860C>T (rs196952080) в гене дистрофина (*DMD*), которая вызывает новый стресс-синдром свиней [11]. Этот однонуклеотидный полиморфизм приводит к аминокислотной замене аргинина на триптофан в кодоне 1958 (R1958W), что ведет к уменьшению экспрессии дистрофина в диафрагме, поясничной и длиннейшей мышце спины [12, 13]. Из-за локализации гена на X-хромосоме, стресс-синдром, как правило, встречается в основном у хряков, унаследовавших X-хромосому с дефектным аллелем от матери. Наибольшая восприимчивость к стрессу у свиней отмечается в возрасте двух-трех месяцев, который проявляется в виде проблем с дыханием после стрессовой ситуации. Такие животные становятся малоподвижными и редко восстанавливаются

после стресса. На данный момент отсутствует информация о распространении мутантного аллеля гена *DMD*, обуславливающего развитие стресс-синдрома свиней у племенных животных различных пород, разводимых в Республике Беларусь. Однако согласно решению № 74 от 02.06.2020 г. положения о порядке проведения молекулярной генетической экспертизы племенной продукции государств-членов Евразийского экономического союза, свиньи подлежат обязательному тестированию на RYR-синдром и DMD-стресс-синдром.

Поэтому цель работы заключалась в применении KASP технологии для идентификации полиморфных вариантов (SNP) 1843C>T (*RYR1*) и 5860C>T (*DMD*) и исследовании частоты встречаемости животных носителей мутантных аллелей в выборках свиней белорусской селекции.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования были использованы свиньи белорусской селекции пород ландрас ($n = 171$), йоркшир ($n = 120$), дюрок ($n = 39$).

Материалом для исследования служила ДНК, выделенная из биологического материала — проб ткани (ушной выщип) и спермы. Для выделения ДНК использовали набор реагентов «Нуклеосорб» («Праймтех», Беларусь). Количество выделенной ДНК определяли с помощью флуориметра DeNovix DS 11 FS с использованием набора реагентов для измерения концентрации ДНК DeNovix dsDNA Broad Range Kit (DeNovix, США).

Конкурентную аллель-специфическую ПЦР (KASP, Kompetitive Allele Specific PCR) проводили на приборе CFX96 (Bio-Rad, США). Реакционная смесь для проведения ПЦР (10 мкл) содержала: x2 KASP Мастер Микс, смесь специфических праймеров (KASP Assay mix), деионизированную MQ-H₂O и 10 нг геномной ДНК.

Полимеразную цепную реакцию проводили по программе: 94 °C — 15 мин; 94 °C — 20 с, 60 °C — 1 мин (со снижением каждый цикл на 0,6 °C) — 10 циклов; 94 °C — 20 с, 55 °C — 60 с — 26 циклов. Анализ и учет полученных результатов ПЦР осуществляли с использованием программного обеспечения Bio-Rad CFX Maestro.

Двуаллельная дискриминация достигается за счет конкурентного связывания двух аллель-специфических прямых праймеров. Дискриминацию аллелей для определения генотипов проводили по значениям RFU (относительные

единицы флуоресценции) для каналов FAM и HEX (табл. 1, рис. 1, 2).

Технология KASP позволяет значительно сократить время проведения анализа, что выгодно отличает его от ПЦР-ПДРФ анализа.

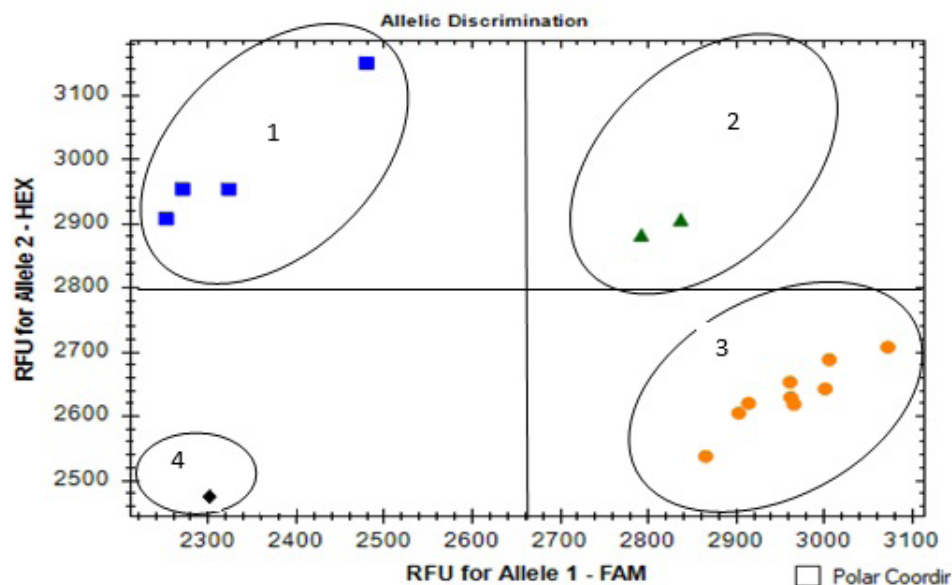


Рис. 1. Дискриминация аллелей однонуклеотидного полиморфизма 5860C>T в гене *DMD* с использованием технологии KASP-генотипирования: 1 кластер — хряки с генотипом TO, свиноматки с генотипом TT, стресс-чувствительные животные; 2 кластер — свиноматки с генотипом TC, животные-носители стресс-чувствительного аллеля; 3 кластер — хряки с генотипом CO, свиноматки с генотипом CC, стресс-устойчивые животные; 4 — контроль без матрицы (NTC)

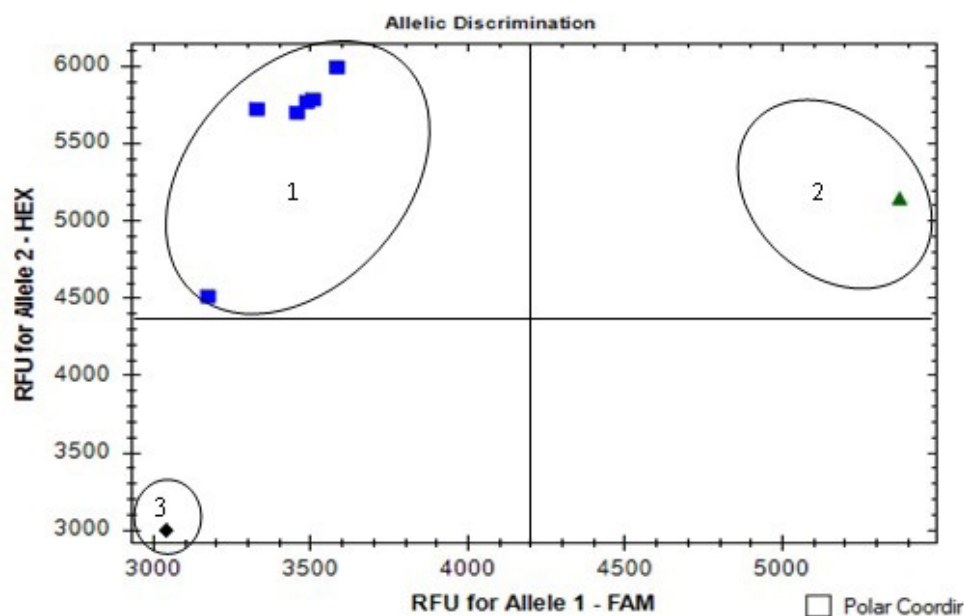


Рис. 2. Дискриминация аллелей однонуклеотидного полиморфизма 1843C>T в гене *RYR1* с использованием технологии KASP-генотипирования: 1 кластер — особи с генотипом NN; 2 кластер — особи с генотипом Nn; 3 — контроль без матрицы (NTC)

Таблица 1

Последовательность нуклеотидов исследуемых локусов генов *RYRI* и *DMD*

Ген	Полиморфизм (SNP)	Последовательность ДНК	FAM Аллель	HEX Аллель
<i>RYRI</i>	rs344435545	CTGGATGTCCTGTGTTCCCTGTGTGTGTGCAATGGTG TGGCCGTG[C/T]GCTCCAACCAAGATCTCATTACTGA GAACTTGCTCCCTGGCCGCGAGCTTCTGCTGCAGA	n	N
<i>DMD</i>	rs196952080	GATGGGGCAGCAATGGCAGTGGAGCCAACCTCAGATCC AGCTCAGCAAGCGCTGG[C/T]GGGAAATTGAGAGCAA ATTTGCTCACTTTCGAAGACTCAACTTTGCACAAATTG	C	T

Результаты и обсуждение

Исследованы выборки свиней пород ландрас, йоркшир и дюрок для определения полиморфизмов в генах *RYRI* и *DMD* методом конкурентной аллель-специфичной ПЦР (KASP). Оценена частота аллелей и генотипов исследуемых полиморфных вариантов генов в выборке племенных животных различных пород свиней, разводимых в Республике Беларусь (табл. 2).

В нашем исследовании не было выявлено животных-носителей злокачественной гипертермии у пород ландрас, йоркшир, дюрок. В проведенном нами ранее анализе полиморфизма гена *RYRI*, в выборке свиней ($n = 482$) разных пород, выявили наличие 4,4% животных-носителей злокачественной гипертермии у породы дюрок, 6,7% у породы крупная белая и 50% у пьетрен [14]. В исследовании Р. И. Шейко частота встречаемости животных-носителей злокачественной гипертермии у крупной белой породы составила 6%, дюрок — 4%, белорусской мясной — 20,5, черно-пестрой пород — 26,0%, и 0,5% поголовья белорусской мясной породы оказалось предрасположенным к стрессам с генотипом nn [15]. Таким образом, внедрение обязательного генотипирования племенных животных по гену *RYRI* в Беларуси позволило выявить и элиминировать из популяции скрытых носителей злокачественной гипертермии.

При исследовании нового PSS-синдрома, ассоциированного с геном *DMD*, в популяциях свиней, разводимых в республике, выявлены животные-носители с генотипом TO/TT только в популяции свиней породы ландрас. Полученные нами данные согласуются с результатами других авторов, которые

показывают наличие дефектного генотипа в популяциях свиней пород ландрас, однако демонстрируют отсутствие мутантного аллеля Т у других пород свиней [16]. Наше исследование, проведенное не только на хряках, но и на свиноматках, показывает наличие мутантного аллеля с наибольшей частотой встречаемости в выборке животных породы ландрас — 14,2%, дюрок — 1,3% и наименьшей частотой встречаемости дефектного аллеля Т в выборке животных породы йоркшир — 0,8%.

Частота мутантных аллелей, включая рецессивные летальные аллели, увеличивается в популяциях как в результате дрейфа генов из-за небольшого эффективного размера численности популяции, так и в результате направления отбора [17, 18]. Наследственные дефекты обычно возникают в популяции в результате распространения уникальных мутаций от «основателя», которые можно проследить до выдающихся быков-производителей, которые интенсивно использовались для искусственного осеменения по всему миру. Было описано множество летальных аллелей, с высокой частотой встречаемости у крупного рогатого скота [19–21], что обусловлено высоким генетическим вкладом одного быка, от которого получены сотни тысяч дочерей. Однако в свиноводстве, предположительно, такой эффект дрейфа будет менее значимым из-за меньшей интенсивности селекции самцов [22].

Согласно исследованию Пестис В. К. и др. у свиноматки крупной белой породы с генотипом *RYRI* Nn на 1,11 голов рождалось больше живых поросят при более высокой массе гнезда при рождении на 2,51 кг, однако сохранность была ниже, чем у маток

Таблица 2

Частоты аллелей и генотипов исследуемых полиморфных вариантов генов *RYRI* и *DMD*

Ген	Порода	Всего	Частота встречаемости генотипов, %						Частота аллелей, $\pm Sq$	
			n	NN	n	Nn	n	nn	N	n
<i>RYRI</i>	Ландрас	86	86	100	–	–	–	–	1	–
	Йоркшир	70	70	100	–	–	–	–	1	–
	Дюрок	39	39	100	–	–	–	–	1	–
<i>DMD</i>			n	CC/CO	n	CT	n	TO/TT	C	T
	Ландрас	180	134	74,4	41	22,8	5	2,8	0,858 \pm 0,018	0,142 \pm 0,018
	Йоркшир	124	122	98,4	2	1,6	–	–	0,992 \pm 0,006	0,008 \pm 0,006
	Дюрок	39	38	97,4	1	2,6	–	–	0,987 \pm 0,013	0,013 \pm 0,013

с генотипом *RYRI* NN на 25,8%. Выявлено, что животные, характеризующиеся предрасположенностью к стрессам, имели более высокое содержание мяса в туше. Результаты обвалки туш показали, что у гетерозиготных животных *RYRI* Nn количество мяса на 9,1% было выше, чем у гомозиготных *RYRI* NN с одновременно более высоким содержанием сала на 10% [4].

Согласно исследованию Костюниной О. В. и соавторов носители мутантного аллеля T гена *DMD* имеют превосходство по многоплодию, массе гнезда и общему количеству рожденных поросят. Мутация гена *DMD* оказывала значимое влияние на живую массу потомков по завершению выращивания (+3,63 кг) и среднесуточный прирост (+21,65), а также уровень молочности (+0,91 кг) [16].

Таким образом, мы наблюдаем балансирующий отбор, при котором для разведения неосознанно отбирались племенные гетерозиготные животные, обладающие высокими показателями мясной продуктивности. В последние годы велась планомерная работа по элиминации животных-носителей PSE-синдрома у свиней. Однако, высокая частота встречаемости животных-носителей нового стресс-синдрома показывает необходимость ДНК-тестирования свиней по гену *DMD* и включения данного генетического маркера в перечень обязательных для генотипирования при отборе племенных животных для селекции.

Заключение

В результате исследования выборок из пород свиней ландрас, йоркшир, дюрок не было выявлено животных носителей мутантного аллеля n в гене *RYRI*, детерминирующего злокачественную гипертермию. Частота встречаемости животных-носителей нового стресс синдрома, ассоциированного с полиморфизмом в гене *DMD* (генотип TO/TT), составила 2,8% (порода ландрас). Частота встречаемости мутантного аллеля T в выборке животных пород йоркшир — 0,8%, дюрок — 1,3% и ландрас — 14,2%.

Элиминация рецессивных наследственных аномалий в популяциях сельскохозяйственных животных требует разработки и внедрения современных систем ДНК идентификации животных-носителей мутантных аллелей. Предложенный метод конкурентной аллель-специфической ПЦР может быть использован для ДНК-диагностики животных, при включении *DMD*-стресс-синдрома в перечень обязательных для тестирования генетически детерминированных заболеваний у племенных свиней, разводимых в Беларуси. Использование разработанных методов генодиагностики свиней позволит проводить селекцию, не допуская перехода мутантных аллелей в гомозиготное состояние. Таким образом, управление генетическими ресурсами будет способствовать повышению эффективности свиноводства.

Список использованных источников

1. Князев, С. П. Проблемы дискордантности и косегрегации экспрессии галотан-чувствительности свиней с мутацией 1843 С-Т в локусе RYR1 рецептора рианоидина / С. П. Князев, К. Е. Жучаев, В. В. Гарт // Генетика. – 1998. – Т. 34, № 12. – С. 1648–1654.
2. Ogawa, Y. Dysregulation of the gain of CICR through ryanodine receptor1 (RyR1): the putative mechanism underlying malignant hyperthermia / Y. Ogawa // Adv. Exptl. Med. Biol. – 2007. – Vol. 592. – P. 287–294.
3. Марзанов, Н. С. RYR1-ген у свиней отечественных и зарубежных пород / Н. С. Марзанов, Д. А. Фролкин, Н. А. Зиновьева // Доклады Российской Академии сельскохозяйственных наук. – 2001. – № 1. – С. 34–36.
4. Ассоциация полиморфизма гена *RYR1* с показателями продуктивных качеств свиней пород, разводимых в Беларуси / В. К. Пестис [и др.] // Молодой ученый. – 2015. – № 5.2. – С. 33–37.
5. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia / Fujii J. [et al] // Science. – 1991. – Vol. 253. – P. 448–451.
6. Редкое сочетание двух новых однонуклеотидных полиморфизмов в интроне 16 гена рецептора рианоидина *RYR1* у свиней кемеровской породы / Н. С. Юдин [и др.] // Вестник ВОГиС. – 2010. – Т. 14, № 1. – С. 116–121.
7. Basic, I. Stress syndrome: Ryanodine receptor (RYR1) gene in malignant hyperthermia in humans and pigs / I. Basic [et al] // Gomerzic periodicum biologorum. – 1997. – Vol. 99, № 3. – P. 313–317.
8. Screening of RYR1 genotypes in swine population by a rapid and sensitive method / D. E. Ilie [et al] // Romanian Biotechnological Letters. – 2014. – Vol. 19, № 2. – P. 9170–9178.
9. Škrlep, M. Comparison of PRKAG3 and RYR1 gene effect on carcass traits and meat quality in Slovenian commercial pigs / M. Škrlep, T. Kavav, M. Čandek-Potokar Czech // J. Anim. Sci. – 55. – 2010. – P. 149–159.
10. Смирнов, Н. Н. Взаимосвязь генотипов по генам RYR1 и ESR с естественной резистентностью и продуктивностью свиней : автореф. дис. ... канд. с.-х. наук : 06.02.07 / Смирнов Николай Николаевич. – Персиановский. – 2013. – 28 с.
11. Nonneman, Dan J. A defect in dystrophin causes a novel porcine stress syndrome / J., Nonneman [et al] // BMC Genomics 2012. – № 13. – P. 233.
12. Hollinger, K. The physiological response of protease inhibition in dystrophic muscle/ K. Hollinger, J. T. Selsby // Acta Physiol. – 2013. – № 208. – P. 234–244.
13. Новый стресс-синдром у свиней, обусловленный мутацией в гене *DMD* / О. В. Костюнина [и др.] // Племенное дело. – 2015. – № 8. – С. 14–15.
14. Михайлова, М. Е. Исследование генетической структуры популяций свиней по локусу гена *RYR1* / М. Е. Михайлова, Е. Л. Романишко, Н. А. Камыш // Веснік МДПУ імя І. П. Шамякіна. – 2011. – P. 20–24.
15. Шейко, Р. И. Повышение продуктивных качеств сельскохозяйственных животных на основе использования биотехнологических приемов и методов / Р. И. Шейко // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2017. – Т. 61, № 4. – С. 119–128.
16. Костюнина, О. В. Генетическая устойчивость свиней к стрессам и колибактериозам / О. В. Костюнина [и др.] // Достижения науки и техники АПК. – 2018. – То. 32, № 6. – С. 53–55.
17. Derks, M. L. Balancing selection on a recessive lethal deletion with pleiotropic effects on two neighboring genes in the porcine genome / M. L. Derks [et al] // PLoS Genet. – 2018. – Vol. 14, № 9. – P. 1–20.
18. Leroy, G. Inbreeding depression in livestock species: review and meta-analysis / G. Leroy // Anim Genet. – 2014. – Vol. 45, № 5. – P. 618–628.
19. Михайлова, М. Е. Детекция полиморфизма rs456206907 гена *SMC2*, детерминирующего гаплотип фертильности hh3 у крупного рогатого скота / М. Е. Михайлова, Е. Л. Романишко, А. И. Киреева // Молекулярная и прикладная генетика. – 2018. – Т. 25. – С. 67–72.
20. Hoff, J. L. Candidate lethal haplotypes and causal mutations in Angus cattle / J. L. Hoff [et al] // BMC Genomics. – 2017. – Vol. 18, № 1. – С. 799.
21. Зиновьева, Н. А. Гаплотипы фертильности голштинского скота // Сельскохозяйственная биология. – 2016. – Т. 51. – С. 423–435.
22. Knol, E. F. Genomic selection in commercial pig breeding / E. F. Knol, B. Nielsen, P. W. Knap // Animal Frontiers. – 2016. – Vol. 6, № 1. – P. 15–22.

E. L. Ramanishka, M. E. Mikhailova, R. I. Sheyko

IDENTIFICATION OF POLYMORPHISMS 1843C>T IN THE *RYR1* GENE AND 5860C>T IN THE *DMD* GENE ASSOCIATED WITH THE STRESS SINDROM OF PIGS USING KASP TECHNOLOGY

Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus
27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, Republic of Belarus
e-mail: lenaramanishko@mail.ru

Pig exposure to stress is a serious economic problem for pig breeding. We have studied genetic factors that determine the sensitivity of pigs to stress in different breeds of pig such as polymorphisms 1843C>T in the *RYR1* gene (rs344435545) and 5860C>T in the *DMD* gene (rs196952080) in the Republic of Belarus using the competitive allele-specific PCR (KASP) method. The frequency of occurrence of animals carrying stress syndrome associated with the *DMD* gene polymorphism (TO/TT genotype) was 2.8% in the Landrace breed. The mutant T-allele was identified in the sample of animals of the Landrace breed with a frequency of 14.2%, in Duroc – 1.3%, in Yorkshire – 0.8%. Mutant n-alleles were not found in the *RYR1* gene in the studied sample of animals. The study results demonstrate that DNA diagnostics of breeding animals is required to identify nonsynonymous substitutions in *RYR1* and *DMD* genes in order to control and eliminate stress syndrome in pig population.

Keywords: pig breeding, genetic defects, DNA testing, KASP, *RYR1*, *DMD*, stress syndrome.

Дата поступления статьи: 22 февраля 2021 г.

З. А. Козловская, Т. А. Гашенко, Ю. Г. Кондратенок, Т. Н. Марцинкевич

ПОЛИМОРФИЗМ ПОПУЛЯЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ПАРШИ ЯБЛОНИ *VENTURIA INAEQUALIS* В БЕЛАРУСИ

Республиканское научно-производственное дочернее унитарное предприятие
«Институт плодородства»

Республика Беларусь, 223013, Минская обл., Минский р-н, аг. Самохваловичи, ул. Ковалева, 2
e-mail: zoya-kozlovskaya@tut.by

Исследования полиморфизма популяции гриба *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint., вызывающего паршу яблони, обусловлены необходимостью разработки и реализации селекционных программ по созданию высокоустойчивых сортов яблони и систем фитосанитарной защиты от патогена. Объектами исследований являлись 125 моноизолятов *V. inaequalis*, выделенных в чистую культуру с пораженных листьев яблони 31 сорта различного генетического и географического происхождения, произрастающих в коллекционном саду РУП «Институт плодородства». Целью исследований являлось установление морфологической и генетической структуры популяций возбудителя парши яблони. Выявлены различия изолятов парши по характеру роста и комплексу морфологических признаков, что позволило разделить их на три морфотипа. Изучение морфокультуральных особенностей изолятов парши позволило определить разнообразие выделенных штаммов, которые будут использованы для создания искусственных инфекционных фонов. Методом фрагментного ДНК-анализа моноспоровых изолятов *V. inaequalis* с использованием SSR-маркеров установлен высокий аллельный полиморфизм в популяции возбудителя парши яблони — выявлено 218 аллелей, что обусловлено наличием полового процесса в жизненном цикле патогена. Установлена высокая степень генетического разнообразия возбудителя парши яблони как в пределах популяции, так и в пределах группы штаммов, выделенных с одного сорта.

Ключевые слова: парша яблони, моноспоровые изоляты, *Venturia inaequalis*, морфотипы, генетическое разнообразие, SSR маркеры, Беларусь.

Введение

Парша яблони, вызываемая аскомицетом *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter, является основным заболеванием одной из самых распространенных плодовых культур — яблони [1]. Учитывая активное развитие отрасли плодородства в Беларуси в последние десятилетия, увеличение площадей, занятых промышленными садами яблони, растущий спрос на экологически чистую продукцию плодородства, селекция на устойчивость к парше по-прежнему актуальна. В данном направлении оценка и отбор исходного материала и создаваемых гибридов наиболее результативны при использовании искусственных инфекционных фонов, что предполагает знание структуры популяций патогенов, выявление и включение в состав инокулюма наиболее патогенных биотипов возбудителей болезни. Знание качественного состава

популяции патогена, динамики его расового состава позволяет прогнозировать развитие болезни и продолжительность сохранения устойчивости сортов.

Анализ генетического разнообразия патогена в природных и антропогенных экосистемах дает возможность оценить микроэволюционные процессы взаимодействия патогена и растения-хозяина. Так, группой ученых из Франции, Бельгии и Китая в масштабном эксперименте было показано, что *V. inaequalis* возникла в Центральной Азии в центре происхождения *Malus* spp. [2, 3]. При этом генетическое разнообразие популяций *V. inaequalis*, выявленных на *M. sieversii* в Центральной Азии, было больше, чем в европейской популяции *M. × domestica* и *M. sylvestris*, и отражало возраст их существования. Зависимость генетического разнообразия *V. inaequalis* от возраста популяции отмечали и другие авторы [4, 5].

Во многих популяционных исследованиях этого патогена гриба была показана высокая степень внутривидового разнообразия и низкая дифференциация между популяциями [6–9]. Существование огромных панмиктических популяций патогена при достаточно скромном потенциале естественного распространения объясняется интенсивным потоком генов, обусловленным деятельностью человека (перемещение зараженного посадочного материала и плодов).

В литературных источниках последних лет, отражающих исследования биологических особенностей развития грибных болезней на плодовых культурах, показаны изменения в филогенезе и онтогенезе популяций грибов под воздействием экологических стрессов. Изучение структуры популяции возбудителей парши было начато во второй половине 20 века. О штаммовых различиях в патогенности и стабильности патогенных свойств *V. inaequalis* сообщали D. H. Palmer, M. Schmidt, J. B. Julien и L. P. S. Spangelo, C. F. Rudloff, G. W. Keitt, M. H. Langford, Н. А. Дорожкин, Л. В. Бондарь и Н. А. Коновалова [10–15]. В условиях Республики Беларусь изучение внутривидового состава популяций возбудителя парши яблони проводилось в разные годы Н. А. Коноваловой [16], Л. В. Бондарь [17, 18], В. С. Комардиной [19–21], Т. А. Гашенко [22–26].

Внутривидовой состав популяции возбудителя парши яблони не постоянен не только в различные годы, но даже в течение вегетационного сезона. Гетероталлический гриб *V. inaequalis* характеризуется наличием в жизненном цикле обязательного этапа половой рекомбинации [27]. Регулярно меняется и сортимент садовых насаждений яблони. Современная интенсивная технология возделывания также оказывает влияние на процесс формирования внутривидового разнообразия возбудителя и усиление вредоносности болезни. Нашими исследованиями установлено увеличение генетического разнообразия популяции возбудителя парши яблони *V. inaequalis* за последние 40 лет, обусловленное качеством и количеством генотипов, отмечено увеличение количества генов вирулентности в составе одного генотипа [25]. Большинство изученных нами штаммов имели в своем генотипе 5–12

генов вирулентности каждый, тогда как в конце 70-х гг. XX века их количество не превышало 4 [28]. Способность штаммов возбудителя парши поражать все большее количество сортов с различными типами устойчивости к заболеванию возрастает, и, как следствие, наблюдается ежегодное проявление эпифитотий парши. В связи с этим возникла реальная необходимость поиска новых источников устойчивости, включая источники с наиболее полным сочетанием разных генов устойчивости в одном генотипе.

Исследование генетического разнообразия микроорганизмов, в силу специфических особенностей объекта, связано с необходимостью разделения сложных по составу природных популяций с помощью метода чистых культур. Метод чистых культур позволяет проводить изучение отдельных признаков микроорганизма в стандартизированных условиях культивирования, в которых они проявляются четко, тогда как в условиях естественной среды на них могут влиять неконтролируемые факторы, в том числе взаимодействие с другими организмами, искажая их проявление.

Изучение популяционной динамики начинают с оценки морфолого-культуральных признаков патогена, которая и была основным методом до появления ДНК-маркерных систем. Этот способ не потерял своей актуальности и в настоящее время в рамках предварительной оценки генетического разнообразия, а также как дополнительный к молекулярному маркированию метод. Преимущество современных молекулярно-генетических методов заключается в высокой универсальности, точности, относительной простоте проводимого анализа, поэтому они востребованы в области диагностики и идентификации различных объектов, в том числе возбудителей заболеваний растений. Изучение генетической структуры популяции возбудителя парши яблони, сопряженное с морфологическим описанием, является важным направлением исследований в прогнозировании скорости появления и распространения новых патотипов возбудителей парши.

Цель исследований — установление морфологической и генетической структуры популяции *Venturia inaequalis*, сложившейся в настоящее время.

Материалы и методы

Объектами исследований являлись 125 моноспоровых изолятов гриба *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint., выделенных в чистую культуру с пораженных плодов и листьев яблони различных по генетическому происхождению сортов, собранных в коллекционном саду РУП «Институт плодоводства». Выделение возбудителей парши яблони в чистую культуру проводили по общепринятым в фитопатологии методикам [29, 30]. Для культивации патогенов использовали модифицированную среду Чапека. Каждый моноизолят сохраняется в 2 экземплярах в лаборатории при температуре +18...+20 °С и естественном освещении.

Описание морфологических признаков чистых культур гриба проводили при достижении ими 30-дневного возраста. При описании культурально-морфологических признаков моноизолятов учитывали форму, размер и край колоний, цвет, наличие выпуклости (центрального бугра), плотность колонии и ростовой коэффициент, интенсивность спороношения, обилие и характер мицелия [29]. Цвет колоний определяли по шкале А. С. Бондарцева [30]. Степень спороношения определяли с помощью камеры Горяева. По окончании описания признаков вычисляли ростовой коэффициент (РК) для каждого моноизолята по формуле:

$$PK = \frac{d \times h \times g}{t}, \text{ где}$$

- d — диаметр колонии, мм;
- h — высота колонии, мм;
- g — плотность колонии, балл;
- t — возраст колонии в сутках.

Признаки оценивали визуально, при определении спороношения осуществляли микроскопирование препарата мицелия из края колонии в раздавленной капле воды при 600-кратном увеличении.

Препараты ДНК выделяли с помощью набора Genomic DNA Purification Kit фирмы Thermo Fisher Scientific. Выделение проводили согласно рекомендованному протоколу. ПЦР проводили на амплификаторе C1000 Touch Thermal Cycler BioRad. Реакционная смесь для проведения ПЦР с конечным объемом 10 мкл,

имела следующий состав: 5,0 мкл Quick-Load TAQ 2X Master Mix», 10 мкМ каждого праймера (SSR-маркера), ДНК-матрицу (20 мкг/мкл) — 0,5 мкл, смесь доводили до объема 10,0 мкл milliQ водой.

Для проведения анализа были отобраны 8 пар SSR-маркеров [27, 31]. Основными критериями отбора являлись уровень полиморфизма и диапазон размеров амплифицируемых фрагментов для оптимального их сочетания в мультиплексных наборах.

ПЦР проводили при следующих температурных условиях: 94 °С 4 мин; 40 циклов, включающих: 40 с 94 °С, 1 мин 58 °С, 1 мин 72 °С; 7 мин 72 °С. Для подтверждения наличия продуктов амплификации предварительно визуализировали в 1,5% агарозном геле в 0,5X TBE буфере. Далее продукты ПЦР визуализировали в ультрафиолетовом свете. Фрагментный анализ проводили на генетическом анализаторе «GenomeLab GeXP Beckman Coulter». В качестве стандарта при отработке экспериментальных параметров ПЦР использовали GenomeLab DNA Size Standard Kit — 600 (Beckman Coulter). Анализ полиморфизма ДНК проводили с помощью программы Treecop.

Результаты и обсуждение

Морфологическая структура популяции

В течение вегетационных периодов 2018 и 2019 гг. с момента появления первых признаков поражения с пораженных листьев и плодов яблони различного сортового и видового состава проведено выделение возбудителя парши в чистую культуру. Всего выделено 125 моноспоровых изолятов возбудителя парши яблони *V. inaequalis* с сортов: *M. purpurea* Elea — 6, Антей — 3, Антоновка — 6, Ауксис — 5, Банановое — 7, Белана — 16, Белорусское летнее — 2, Белорусское сладкое — 2, Бельфлер-китайка — 4, Голден Граймс (Golden Graims) — 3, Дарунак — 4, Джонаголд (Jonagold) — 4, Дьямент — 1, Женева Эрли (Geneva Early) — 5, Зорка — 1, Красавица — 1, Лошицкое — 1, Лучезарное — 6, Мелба — 7, Мечта — 6, Минкар — 1, Нававица — 2, Папировка Белсад — 6, Ром Бьюти (Rome Beauty) — 4, Сеянец Лавфамы — 1, Суйслепское — 6, Сябрына — 4, Топаз — 5, Уэлси (Wealthy) — 1, Харальсон — 3, Чемпион (Šzampion) — 2.

Для удобства и простоты в работе штаммы (моноизоляты) были обозначены первыми буквами сортов, с листьев и плодов которых они были выделены. Так, с листьев сортов яблони были выделены штаммы: *M.purpurea* Elea — М.р.Е.-1 — М.р.Е.-6; Антей — Ан-1 — Ан-3; Антоновка — Ат-1 — Ат-6; Аукси (Auksis) — Ак-1 — Ак-5; Банановое — Б-1 — Б-7; Белана — Бл-1 — Бл-16; Белорусское летнее — БЛ-1, БЛ-2; Белорусское сладкое — Бсл-1 и Бсл-2; Бельфлер-китайка — Бк-1 — Бк-4; Голден Граймс — Gg-1 — Gg-3; Дарунак — Д-1 — Д-4; Джонаголд — Дж-1 — Дж-4; Дыямент — Дм-1; Женева Эрли — ЖЭр-1 — ЖЭр-5; Зорка — Зр-1; Красавица — Кр-1; Лошицкое — Л-1; Лучезарное — Лч-1 — Лч-6; Мелба — Мл-1 — Мл-7; Мечта — Мч-1 — Мч-6; Минкар — Мн-1; Нававица — Нв-1 и Нв-2; Папировка Белсад ПрБ-1 — ПрБ-6; Ром Бьюти — РБ-1 — РБ-4; Сеянец Лавфама — СЛ-1; Суйслепское — Сл-1 — Сл-6; Сябрына — С-1 — С-4; Топаз — Тп-1 — Тп-5; Уэлси — У-1; Харальсон — Х-1 — Х-3; Чемпион — Ш-1 и Ш-2.

По результатам изучения морфо-культуральных признаков все штаммы возбудителя парши яблони (*V.inaequalis*) были разделены на 3 морфотипа, которые после пассажей на искусственной питательной среде сохраняли свои морфологические признаки. Выделение морфотипов осуществляли по характеру роста и комплексу морфологических признаков (цвет колоний, характер мицелия, край колонии и др.).

Морфотип I. После месячного инкубирования колонии достигали 4,0-10,0 мм в диаметре, ростовой коэффициент (РК) составил — 0,9–9,5. Колонии в основном средней плотности, буровато-серые или оливково-серые с выпуклым, большим буровато-серым центральным бугром. Край колонии нечеткий, неровный, пушистый, лучистый. Мицелий темно-оливкового цвета, членистый, иногда извилистый с утолщениями, тонкий или средней толщины, с конидиями темно-оливкового или бурого цвета, большими по величине, удлиненно-грушевидной формы. Интенсивность спороношения средняя или высокая. К этой группе относится 32,0% изолятов: Gg-3, М.р.Е.-1 – М.р.Е.-6, Ак-1, Ак-2, Ат-1 – Ат-4, Ат-6, Б-3, Б-4, Бк-1, Бк-3, Бк-4, БЛ-1, БЛ-2,

Бл-13, Бсл-1, Бсл-2, ЖЭр-3 – ЖЭр-5, Кр-1, Мч-2, Мч-4, ПрБ-2 – ПрБ-4, ПрБ-6, Сл-3, Тп-3, Тп-4, Тп-5, Х-3.

Морфотип II. Колонии данного морфотипа имели размер 10,5–20,0 мм, ростовой коэффициент — 3,8–19,3, плотные и средней плотности, оливково-серые или буро-оливковые. Центральный бугор большой или среднего размера и средне-выпуклый, светло-серого или светло-оливкового цвета, иногда со светло-желтоватыми или светло-оливковыми пятнышками. Край колонии от буровато-оливкового до бурого, неровный, нечеткий. Мицелий от светло-оливкового до темно-оливкового цвета, ветвистый, от тонкого до средней толщины, членистый иногда с утолщениями. Конидии крупные или средней величины, в основном грушевидной иногда лимоновидной формы. Штаммы II морфотипа характеризуются в основном средней интенсивностью спороношения, иногда высокой. В эту группу вошли 57,0% изолятов: Gg-1, Gg-2, Ак-3 – Ак-5, Ан-1 – Ан-3, Ат-5, Б-1, Б-2, Б-5 – Б-7, Бк-2, Бл-1 – Бл-6, Бл-8 – Бл-12, Бл-14 – Бл-16, Д-1 – Д-4, Дж-3, Дм-1, ЖЭр-1, ЖЭр-2, Зр-1, Л-1, Лч-1 – Лч-6, Мн-1, Мч-1, Мч-3, Мч-5, Мч-6, Нв-2, ПрБ-1, ПрБ-5, РБ-1 – РБ-4, С-1 – С-4, СЛ-1, Сл-1, Сл-2, Сл-4 – Сл-6, Тп-2, Х-1, Х-2, Ш-1, Ш-2.

Морфотип III. Колонии характеризуются от 21,0 до 30,0 мм в диаметре с ростовым коэффициентом 6,8–28,0. Колонии плотные, от серо-оливкового до буро-оливкового цвета, войлочные. Данные колонии характеризуются маленьким или средним, слабо или средне-выпуклым центральным бугром оливкового цвета со светло-оливковыми зонами. Край колонии четкий, буроватый или бурый. Мицелий темно-оливкового цвета, в основном средней толщины, иногда извилистый с утолщениями. Конидии крупные, темно-оливкового цвета, овальной или грушевидной формы. Интенсивность спороношения в основном слабая или средняя. К этой группе относится 11,0% изолятов: Бл-7, Дж-1, Дж-2, Дж-4, Мл-1 – Мл-7, Нв-1, Тп-1, У-1.

Генетическая структура популяции

Методом SSR-анализа определено разнообразие аллелей в 8 локусах у 125 моноспоровых изолятов *V.inaequalis* и выявлено 218 аллелей. Все рассматриваемые локусы оказались

полиморфны. При этом количество аллелей, идентифицированных у изолятов *V. inaequalis* в каждом локусе, различается.

Маркер 1tc1b выявил в популяции *V. inaequalis* 12 аллелей на локус размером 152–199 п. н., маркер Vitg 9/129 — 14 аллелей в пределах 280–300 п. н. В локусах 1tc1a и Vitcа выявлено 28 и 23 аллелей соответственно в каждом. Наибольшее количество аллелей (34, 37, 34 и 36) было выявлено в локусах Vitc1/2, Vitc 2/D, 1tc1g и Vica 10/154. Проведенный анализ показал высокий аллельный полиморфизм в популяции возбудителя парши яблони, что обусловлено активным обменом генами в ходе половой стадии развития патогена, при которой происходит рекомбинация признаков в пределах отдельной популяции.

Поскольку возбудитель парши яблони *V. inaequalis* в конидиальной стадии развития является гаплоидом, каждый из SSR-маркеров, как правило, выявляет 1 аллель в генотипе штамма, однако в некоторых изученных микросателлитных локусах выявлено по 2, а в одном случае — 3 аллеля. Подобные результаты были

получены исследователями в Швейцарии [6] и России [32], которые объясняли данный факт несколькими причинами: мутацией изолята в процессе культивирования, перекрестной контаминацией при экстракции ДНК и контаминацией на этапе отбора моноспоровых изолятов. В то же время следует отметить, что обнаружение более одного аллеля в локусе изолята подтверждает точность, надежность и эффективность выбранного метода анализа для изучения генетического разнообразия возбудителя парши.

Данные о составе аллелей, выявляемых с помощью 8 пар SSR-маркеров, были использованы для построения дендрограммы филогенетического сходства моноизолятов *V. inaequalis* (рис.).

Анализ дендрограммы позволил выделить несколько кластеров. Ряд штаммов с одного сорта, введенные в культуру, образовали четкие группы в пределах одного кластера и находятся на минимальном генетическом расстоянии друг от друга, что свидетельствует об их близком генетическом родстве: это все

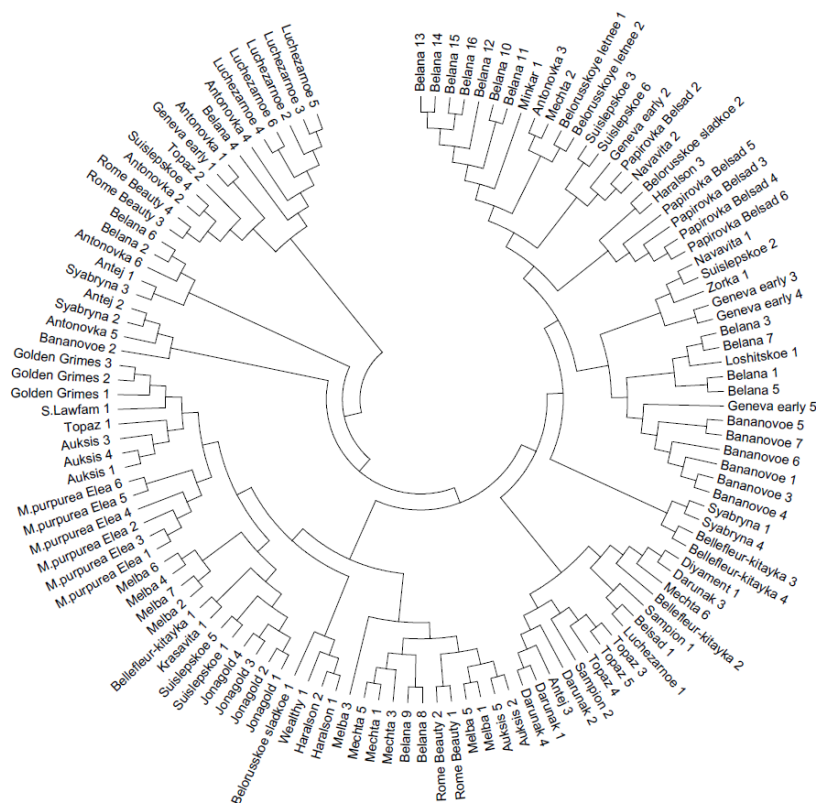


Рис. Дендрограмма генетического сходства изолятов *V. inaequalis*, построенная на основе результатов анализа 8 SSR-локусов

штаммы, выделенные с *M.purpurea* Elea 1-6, Jonagold 1-4, Golden Grimes 1-3, Belorusskoe letnee 1-2. Также следует отметить, что все штаммы, выделенные с сортов *M.purpurea* Elea и Belorusskoe letnee, по своим морфо-культуральным признакам были также близки и вошли в I морфотип. Штаммы, выделенные с сортов Jonagold и Golden Grimes, имели различия в морфологии и составили II–III и I–II морфотипы соответственно.

С другой стороны, установлено, что штаммы, поражающие один сорт, могут входить в кластеры, располагающиеся на значительном генетическом расстоянии друг от друга. Так, семь изолятов парши с сорта Белана — Belana 10–16 (Бл10–Бл16), имеют идентичный аллельный набор и формируют один кластер, являясь представителями II морфотипа, за исключением штамма Бл-13 (I морфотип). Ближе всего к ним в дендрограмме расположены штаммы Бл-1, Бл-5, Бл-3, Бл-7 — представители II морфотипа, кроме штамма Бл-7. Наиболее далекими в генетическом отношении оказались штаммы Бл-4, Бл-6, Бл-2, Бл-8 и Бл-9, хотя имели схожие морфологические признаки и являются представителями II морфотипа. Аналогичное распределение наблюдается у штаммов, выделенных с сорта Антоновка, которые входят в 4 различных кластера и один морфотип. Штаммы, выделенные с сортов Топаз и Geneva Early, выделяются особым полиморфизмом: вошли в три разные кластера и имели разную морфологию.

Сопоставление полученного генетического профиля и построенной на его основе дендрограммы с морфо-культуральными признаками штаммов показало отсутствие выраженной связи между ними. В большинстве выделенных кластеров оказались штаммы разных морфотипов, чаще I и II. Так, в первый кластер вошли 3 штамма выделенные с сорта Антоновка (Ат-1, Ат-2, Ат-4) и 10 штаммов II морфотипа сорта Лучезарное (Лч-2–Лч-6), Geneva Early (Жр-1), Топаз (Тп-2), Суйслепское (Сл-4), Rome Beauty (РБ-3, РБ-4). Кластеры 2, 5, 6 и 8 также сформированы штаммами только I и II морфотипов. Два крупных кластера — 4 и 7 — включают все 3 морфотипа *V.inaequalis*. И только кластер 3 представлен штаммами II морфотипа, выделенными с четырех сортов Антей, Сябрына, Антоновка, Банановое.

Заключение

Парша яблони, вызываемая аскомицетом *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter, является основным заболеванием яблони — самой распространенной плодовой культурой Беларуси. Знание расового состава популяции патогена позволяет прогнозировать развитие болезни и продолжительность сохранения устойчивости сортов.

Способность штаммов возбудителя парши поражать все больше сортов возрастает, и, как следствие, наблюдается ежегодное проявление эпифитотий парши. В связи с этим возникла реальная необходимость установления морфологической и генетической структуры популяций возбудителя парши яблони.

Установлена высокая степень генетического и морфологического разнообразия возбудителя парши яблони как в пределах отдельно взятой популяции, так и в пределах группы штаммов, выделенных с одного сорта яблони.

Наибольшим разнообразием отличаются моноизоляты парши, выделенные с сортов яблони Белана и Антоновка.

Сравнительный анализ генетического профиля штаммов *Venturia inaequalis* с их морфо-культуральными признаками показал отсутствие выраженной связи между ними. Возможно, это обусловлено высокой степенью внутривидового разнообразия и низкой дифференциацией между популяциями возбудителя парши.

Список использованных источников

1. Козловская, З. А. Селекция яблони в Беларуси / З. А. Козловская. — Минск: Беларуская навука, 2015. — 457 с.
2. Gladieux, P. On the origin and spread of the scab disease of apple: out of Sentral Asia / P. Gladieux, X. G. Zhang, D. Afoufa-Bastien // PLoS ONE. — 2008. — Vol. 3, № 1. — P. 1455. doi: 10.1371/journal.pone.0001455).
3. Gladieux, P. Evolution of the population structure of *Venturia inaequalis*, the apple scab fungus, associated with the domestication of its host / P. Gladieux, X.G. Zhang, I.R. Roldan-Ruiz // Mol. Ecol. — 2010. — Vol. 19, № 4. — P. 658–674. doi: 10.1111/j.1365-294X.2009.04498.x.
4. Xu, X. M. Population variation of apple scab (*Venturia inaequalis*) isolates from Asia and Europe Plant Dis. / X. M. Xu, J. R. Yang,

- V. Thakur. – 2008. – Vol. 92. – P. 247–252. doi: 10.1094/PDIS-92-2-0247.
5. Xu, X. Population variation of apple scab (*Venturia inaequalis*) within mixed orchards in the UK / X. Xu, J. Yang, V. Thakur // European journal of plant pathology. – 2013. – Vol. 135, № 1. – P. 97–104. doi: 10.1007/s10658-012-0068-4.
6. Tenzer, I. Identification of microsatellite markers and their application to population genetics of *Venturia inaequalis* / I. Tenzer, S. Degli-Ivanissevich, M. Morgante // Phytopathology. – 1999. – Vol. 89, № 9. – P. 748–753.
7. Tenzer, I. Subdivision and genetic structure of four populations of *Venturia inaequalis* in Switzerland / I. Tenzer, C. Gessler // Eur. J. Plant. Pathol. – 1997. – Vol. 103. – P. 565–571.
8. Khajuria, Y. P. Molecular characterization of *Venturia inaequalis* causing apple scab in Kashmir / Y. P. Khajuria, S. Kaul, M. K. Dhar // Open Access Scientific Reports. – 2012. – Vol. 1. – P. 339. doi: 10.4172/scientificreports.339.
9. Padder, B. A. Virulence and molecular diversity of *Venturia inaequalis* in commercial apple growing regions in Kashmir / B. A. Padder, T. A. Sofi, M. Ahmad // J. Phytopathol. – 2013. – Vol. 161. – P. 271–279. doi: 10.1111/jph.12061.
10. Palmiter, D. H. Variability in monoconidial cultures of *Venturia inaequalis* / D. H. Palmiter // Phytopathology. – 1934. – Vol. 24. – P. 22–47.
11. Schmidt, M. *Venturia inaequalis* (Cooke) Aderhold. V. Weitere Untersuchungen über die auf verschiedenen Bäumen lebenden Populationen des Apfelschorfes / M. Schmidt // Gartenbauwiss. – 1936. – Vol. 10. – P. 422–427.
12. Julien, J. B. Physiological races of *Venturia inaequalis* / J. B. Julien, L. P. S. Spangelo // Can. J. Plant Sci. – 1957. – Vol. 37. – P. 102–107.
13. Rudloff, C. F. *Venturia inaequalis* (Cooke) Aderhold. UI. Zur Formenmannigfaltigkeit des Pilzes / C. F. Rudloff // Gartenbauwiss. – 1934. – Vol. 9. – P. 105–119.
14. Keitt, G. W. *Venturia inaequalis* (Cke.), Wint. 1. A groundwork for genetic studies / G. W. Keitt, M. H. Langford // Am. J. Botany. – 1941. – Vol. 28. – P. 805–820.
15. Дорожкин, Н. А. Агрессивность штаммов возбудителя парши яблони в Беларуси / Н. А. Дорожкин, Л. В. Бондарь, Н. А. Коновалова // Плодоводство. – 1977. – Вып. 3. – С. 125–131.
16. Коновалова, Н. А. Биологическая специализация возбудителя парши яблони в Белорусской ССР: дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.11 / Н. А. Коновалова; Белорус. науч.-исслед. ин-т картофелеводства и плодово-овощеводства. — пос. Самохваловичи, 1977. – 151 с.
17. Бондарь, Л. В. Внутривидовая неоднородность *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint. – возбудителя парши яблони / Л. В. Бондарь, Н. А. Коновалова // Материалы респ. конф. по защите растений / БелНИИ защиты растений. – Минск, 1975. – С. 68–70.
18. Бондарь, Л. В. Сравнительное изучение популяции возбудителя парши яблони по морфологическим признакам / Л. В. Бондарь // Защита растений: сб. науч. тр. / под ред. В. Ф. Самарсова: БелНИИ защиты растений. – Минск, 1988. – Вып. 13. – С. 21–25.
19. Дичковская, В. С. Культурально-морфологические свойства возбудителя парши яблони *Venturia inaequalis* (Cooke.) Wint. (конициальная стадия *Fusicladium dendriticum* (Wallr.) Fuck.) / В. С. Дичковская // Итоги и перспективы развития плодоводства и овощеводства: Мат. междунар. науч.-практ. конф., посвященной 90-летию со дня рождения профессора А. Н. Ипатьева / г. Горки, (21–23 августа 2001 г.) – Горки, 2001. – С. 181–185.
20. Комардина, В. С. Биоэкологические особенности и контроль развития гриба *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint. в яблоневых садах интенсивного типа: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.11 / В. С. Комардина; Прилуки, 2008. – 20 с.
21. Комардина, В. С. Особенности культурально-морфологических признаков возбудителя парши *Venturia inaequalis* (Cooke.) Wint. (конициальная стадия *Fusicladium dendriticum* (Wallr.) Fuck.), выделенных из садов различных типов / В. С. Комардина // Защита растений: сб. науч. тр. / под ред. Л. И. Трешко: Ин-т защиты растений НАН Беларуси. – Минск, 2006. – Вып. 30, ч. 2. – С. 121–128.
22. Козловская, З. А. Внутривидовая неоднородность *Venturia inaequalis* — возбудителя парши яблони / З. А. Козловская, Т. А. Гашенко // Вестник БГСХА / редкол.: А. П. Курдеко (гл. ред.). – Горки, 2009. – № 4. – С. 97–100.

23. Гашенко, Т. А. Внутривидовая неоднородность *Venturia inaequalis* — возбудителя парши яблони / Т. А. Гашенко, З. А. Козловская // Современные технологии сельскохозяйственного производства: Агрономия, Ветеринария, Зоотехния: материалы XVI междунар. науч.-практ. конф. / г. Гродно, (17 мая, 7 июня 2013 г.) — Гомель, 2013. — С. 48–50.
24. Гашенко, Т. А. Вирулентность штаммов *Venturia inaequalis* / Т. А. Гашенко, Ю. Г. Кондратенко, З. А. Козловская // Современные технологии сельскохозяйственного производства: Агрономия, Защита растений: материалы XVII междунар. науч.-практ. конф. / г. Гродно, (14 марта 2014 г.) — Гомель, 2014. — С. 192–194.
25. Козловская, З. А. Оценка вирулентности штаммов возбудителя парши яблони *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint. / З. А. Козловская, Т. А. Гашенко, Ю. Г. Кондратенко // Весці НАН Беларусі. Сер. аграрн. навук. — 2017. — № 3. — С. 60–69.
26. Морфологическая дифференциация *Venturia inaequalis* — возбудителя парши яблони / Т. А. Гашенко [и др.] // Плодоводство: сб. науч. тр. — 2020. — Т. 32. — С. 38–43.
27. Guerin, F. Isolation of 21 new polymorphic microsatellite loci in the phytopathogenic fungus *Venturia inaequalis* / F. Guerin, P. Franck, A. Loiseau // Molecular Ecology Notes. — 2004. — Vol. 4, №2. — P. 268–270.
28. Дорожкин, Н. А. Вирулентность штаммов возбудителя парши яблони / Н. А. Дорожкин, Л. В. Бондарь, Н. А. Коновалова // Микология и фитопатология. — 1979. — Вып. 5. — С. 401–404.
29. Хохряков, М. К. Методические указания по экспериментальному изучению фитопатогенных грибов / М. К. Хохряков. — Ленинград: ВИЗР, 1974. — 69 с.
30. Бондарцев, А. С. Шкала цветов / А. С. Бондарцев. — М.-Л., 1954. — 27 с.
31. Tenzer, I. Genetic diversity of *Venturia inaequalis* across Europe / I. Tenzer, C. Gessler // Eur. J. Plant. Pathol. — 1999. — Vol. 105, № 6. — P. 545–552.
32. Токмаков, С. В. Разработка мультиплексной SSR-маркерной системы для идентификации штаммов парши яблони / С. В. Токмаков, И. И. Супрун, А. И. Насонов // Микология и фитопатология. — 2017. — Т. 51, № 6. — С. 394–403.

Z. A. Kazlouskaya, T. A. Hashenka, J. G. Kandratsenak, T. M. Martsinkevich

POLYMORPHISM OF APPLE SCAB *VENTURIA INAEQUALIS* IN BELARUS

Institute for Fruit Growing, NAS of Belarus
2 Kovalev St., 223013 Samokhvalovichy Agro-town, Minsk District,
Minsk Region, Republic of Belarus
e-mail: zoya-kozlovskaya@tut.by

Study of *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint. polymorphism causing apple scab is due to the need to elaborate and implement breeding programs allowing to develop highly resistant apple varieties and systems of phytosanitary protection against the pathogen. The objects of research were 125 *V. inaequalis* monoisolates isolated in pure culture from the affected apple leaves of 31 varieties of various genetic and geographical origins, growing in the collection orchard of the Institute for Fruit Growing. The study aimed to define the morphological and genetic structure of apple scab pathogen populations. Differences between scab isolates were identified by the growth pattern and a complex of morphological characters that made it possible to divide them into three morphotypes. The study of the morphocultural characters of scab isolates made it possible to determine the diversity of isolated strains that will be used to create artificial infectious backgrounds. The method of DNA fragment analysis of *V. inaequalis* monospore isolates using SSR markers allowed to identify high allelic polymorphism in the population of the apple scab causative agent — 218 alleles were identified due to the presence of a sexual process in the pathogen's life cycle. A high degree of genetic diversity of the apple scab causative agent was identified both within the population and a group of strains isolated from the same variety.

Keywords: apple scab, monosporous isolates, *Venturia inaequalis*, morphotypes, genetic diversity, SSR markers, Belarus.

Дата поступления статьи: 23 февраля 2021 г.

С. С. Левыкина, Н. В. Воронова, Ю. В. Бондаренко

СТРУКТУРА МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА *MACROSIPHUM ALBIFRONS* ESSIG, 1911 — ОПАСНОГО ВРЕДИТЕЛЯ ЛЮПИНА

Белорусский государственный университет
Республика Беларусь, 220030, г. Минск, пр-т Независимости, 4
e-mail: nvoronova@bsu.by

В настоящей работе приведена информация по сборке, аннотации и результатам структурного анализа митохондриального генома тли *Macrosiphum albifrons*. Митохондриальный геном *M. albifrons* имеет предковую структуру и отклонение в сторону содержания адениновых оснований вследствие насыщенности ими региона повторов. Показано наличие полного набора тРНК, в 14 из которых спаренные основания являются аберрантными.

Ключевые слова: тли, митохондриальный геном, *Macrosiphum albifrons*, аннотация, тРНК.

Введение

Семейство настоящие тли (*Aphididae*) — обширный таксон из отряда полужесткокрылых насекомых с рядом специфических характеристик, привлекающих внимание исследователей к его представителям. Для тлей характерен быстрый темп роста популяций вследствие наличия облигатного циклического партеногенеза, наличие различающихся морф внутри одного годичного цикла. При благоприятных условиях эти фитофаги способны к взрывному наращиванию численности, что в конечном счете приводит к потере значительной части урожая и финансовым убыткам в случае, когда речь идет о видах, наносящих ущерб непосредственно промышленно культивируемым культурам.

Люпиновая тля (*Macrosiphum albifrons* Essig) впервые была отмечена на территории Республики Беларусь в 2010 г. [1]. *M. albifrons* специализируется на представителях рода *Lupinus*. Ввиду широкого возделывания люпина как сельскохозяйственной и декоративной культуры, на данный момент люпиновая тля отмечается на территории всех агроклиматических областей Беларуси, являясь при этом переносчиком вирусных заболеваний люпина. Питание *M. albifrons* приводит к хлоротизации листьев и нарушению нормального протекания различных физиолого-биохимических процессов в растении. Продолжительное питание тли приводит к угнетению

роста люпина и, следовательно, снижению выхода конечной продукции — зеленой биомассы и семян, которые активно используют на территории Республики Беларусь в качестве компонента кормовой базы в сфере животноводства.

В настоящее время в комплекс вредителей люпина входит порядка пятидесяти различных видов [2]. Люпиновая тля относительно недавно пополнила данный перечень, являясь инвазивным для фауны Европы видом [3]. Не исключено, что в ближайшие годы *M. albifrons* сформирует сплошной ареал территории Республики Беларусь, по причине расширения территории возделывания люпина, а также произрастания люпина многолистного (*Lupinus polyphyllus* Lindl.) в лесных массивах [4]. В отличающихся от привычных для *M. albifrons* природно-климатических условиях, не исключена вероятность его расселения на другие виды растений как результат процессов адаптивной микроэволюции.

У насекомых митохондриальный геном имеет небольшой размер, что делает его удобной моделью для изучения микроэволюционных процессов [5–7]. В его кольцевой структуре локализованы 13 белок-кодирующих генов, 22 гена транспортных РНК и 2 гена рибосомальных РНК большой и малой субъединицы митохондриальных рибосом [8, 9]. Гены в митохондриальном геноме могут

частично перекрываются, нередко несколько нуклеотидов одновременно относятся как к старт-кодону гена, так и к терминирующему кодону вышележащего гена. Интересной особенностью митохондриального генома насекомых является отсутствие полноценного терминирующего кодона в белок-кодирующем гене *Nad4*. Его нуклеотидная последовательность заканчивается единичным тиминовым основанием и предполагается, что полноценный стоп-кодон ТАА формируется после завершения транскрипции, на стадии аденилирования мРНК.

Несмотря на количество накопленных на сегодняшний момент данных о митохондриальных геномах насекомых, некоторые особенности структуры митогенома до сих пор плохо изучены. Так, например, филогенетическая применимость, причина сдвига базовой асимметрии нуклеотидов и функции количественного и качественного состава нуклеотидных повторов в регионе формирования D-петли окончательно не установлены.

Митохондриальные геномы являются значимым объектом исследований в области молекулярной эволюции. В последние десятилетия митохондриальная ДНК используется при определении генетической структуры популяции внутри вида, а также при определении филогенетической близости между видами. Особый интерес представляют митохондриальные перестройки генов у разных видов из-за их редкости, в связи с эволюционно сложившейся консервативности в организации структуры у тлей [10, 11].

Нуклеотидные последовательности митохондриальных геномов используются не только при исследовании насекомых, но и других животных. Использование в популяционно-генетических и филогенетических исследованиях отдельных генов митогенома уже считается классическим приемом [12, 13]. Так, например, участок гена *Cox1* активно используется в качестве общепризнанного универсального филогенетического маркера для животных, а гены рибосомальных РНК применяются для построения филогений на уровне классов [14]. На сегодняшний момент из более чем 5000 описанных видов тлей из 24 подсемейств, нуклеотидные последовательности полных митохондриальных геномов известны

только для 43 видов из 6 подсемейств [15]. Ограниченный ресурс доступных митохондриальных геномов затрудняет проведение сравнительных исследований. Так, например, митогеномы для тлей рода *Macrosiphum* в нуклеотидных базах данных отсутствуют, в то время как среди рода *Aphis* представлены для 4 видов (*A. gossypii* NC024581.1, *A. glycines* MK111111, *A. fabae mordvilkoii* MG897128, *A. craccivora* MT095075, *A. craccivora* KX447142.1, *A. craccivora* NC_031387.1), некоторые из которых продублированы.

В рамках этой работы мы поставили перед собой задачу изучить структурную организацию митохондриального генома *M. albifrons*, данные о котором будут представлены впервые для науки. Расшифрованный митогеном позволит проводить исследования внутривидовой структуры экономически значимого для Беларуси инвайдера *M. albifrons*.

Материалы и методы

Колония *M. albifrons* была собрана в г. Минске (Беларусь) с *Lupinus luteus*. Собранные образцы хранили в спирте с концентрацией 96% при температуре -80°C . Видовая принадлежность образцов была подтверждена кандидатом биологических наук, доцентом Д. Г. Жоровым на основании существующих морфологических и морфометрических ключей. Тотальная ДНК была выделена с использованием набора Blood-Animal-Plant DNA Preparation Kit (Jena Bioscience). Пробоподготовка проводилась с использованием библиотеки Truseq 350. Секвенирование было проведено по технологии Illumina на приборе miseq в Республике Корея, после чего полученные результаты были переданы в виде не подвергнутых какой-либо обработке данных. Объем полученных данных составил 45 GB, что соответствует примерно 100-кратному покрытию генома. Митохондриальный геном был извлечен и собран с использованием NovoPlasty v. 2.7.1 [16].

Аннотация митохондриального генома была осуществлена путем гомологичного выравнивания с доступными последовательностями близкородственных видов из Genbank NCBI, с последующей ручной валидацией полученных данных (табл. 1).

Все тРНК-гены *M. albifrons* были идентифицированы при помощи онлайн-сервиса

Таблица 1

Нуклеотидные последовательности, используемые для аннотации митогенома *M. albifrons*

Название вида	Подсемейство	Триба	Код доступа в Genbank
<i>Sitobion avenae</i>	Aphidinae	Macrosiphini	NC_024683.1
<i>Diuraphis noxia</i>			NC_022727.1
<i>Cavariella salicicola</i>			NC_022682.1
<i>Indomegoura indica</i>			NC_045897
<i>Aphis craccivora</i>		Aphidini	NC_031387.1
<i>Aphis craccivora</i>			KX447142.1
<i>Aphis gossypii</i>			NC_045897
<i>Aphis aurantii</i>			MN397939
<i>Aphis citricidus</i>			NC_043903
<i>Cervaphis quercus</i>		Greenideinae	Cervaphidini
<i>Greenidea psidii</i>	Greenideini		NC_041198.1
<i>Floraphis meitanensis</i>	Eriosomatinae	Fordini	MF043990.1
<i>Eriosoma lanigerum</i>		Eriosomatini	KP722582.1

ARWEN [17] с дополнительной визуализацией в программе VARNA [18]. Локализацию региона повторов и региона формирования D-петли определяли по границам соседних генов. Тандемные повторы в данных областях были обнаружены с помощью веб-сервера Tandem Repeats Finder [19]. Шпильчатая структура D-петли была визуализирована также при помощи программы VARNA. Карта митохондриального генома *M. albifrons* была построена в программе SnapGene с соблюдением реальных генных пропорций (GSL Biotech; на сайте snapgene.com). Нуклеотидный состав была рассчитана при помощи анализа Compute Nucleotide Composition в программе MEGAX [20].

Последовательность полного митохондриального генома *M. albifrons* была депонирована в GenBank NCBI, где ей был присвоен следующий код доступа — MW659868.

Результаты и обсуждение

Размер полного митохондриального генома *M. albifrons* составил 15,395 Kb. Содержание аденин-тиминовых оснований в митохондриальной ДНК составило 84,1%. В целом такая картина является довольно типичной для митохондриальных геномов тлей трибы Macrosiphini [21]. Высокое содержание аденин-тиминовых оснований характерно

для митохондриальных геномов тлей ввиду высокой консервативности этих геномов и обычно отличается не более, чем на десятые доли процента, иногда — несколько процентов [22], в то время как нуклеотидный состав среди близкородственных видов варьирует в широком диапазоне [23, 24].

В представленном геноме пропорция $(A+T)/(G+C) > 80/20$ наблюдается во всех функциональных областях (табл. 2).

Все белок-кодирующие гены показали высокое смещение нуклеотидного состава в сторону адениновых и тиминовых оснований. Содержание A+T нуклеотидов в разных областях митохондриального генома *M. albifrons* варьировалось в области значений 82,3–88,7%. Наиболее насыщенным аденин-тиминовыми основаниями оказался регион повторов, что объясняется наличием в данной области множества AT-повторов, характерных для этого участка. В целом в белок-кодирующих генах наблюдается отрицательное значение AT- и GC- отклонения, что означает преимущественное содержание тиминовых и цитозиновых оснований в генах. Аналогичное предпочтение выявлено для области формирования D-петли. Интересно, что в целом по геному наблюдается AT-смещение в сторону аденина в сравнении с тиминном, несмотря на то, что сумма длин областей,

Таблица 2

Нуклеотидный состав митохондриального генома *M. albifrons*

Область	Содержание нуклеотидов, %							Длина, п. н.
	A	T	G	C	A+T	AT-отклонение	GC-отклонение	
Полный геном	45,3	38,8	5,9	10,0	84,1	0,077	-0,261	15395
Белок-кодирующие гены	35,5	48,1	7,8	8,6	83,5	-0,150	-0,050	10971
Белок-кодирующие гены (+)-цепи	38,5	43,8	6,9	10,8	82,3	-0,064	-0,224	6756
Белок-кодирующие гены (-)-цепи	30,6	54,9	9,3	5,1	85,5	-0,284	0,292	4215
Гены тРНК	44,6	40,7	6,1	8,6	85,3	0,046	-0,170	1445
Гены рРНК	46,1	38,6	5,1	10,3	84,7	0,089	-0,340	2039
Регион D-петли	42,6	42,7	4,9	9,7	85,3	-0,002	-0,326	648
Регион повторов	57,2	31,5	1,6	9,7	88,7	0,289	-0,724	257

Примечание. Все стоп-кодоны белок-кодирующих генов были исключены из анализа

использующих преимущественно адениновые основания, значительно ниже. Так, суммарная длина нуклеотидов для тРНК, рРНК и региона повторов составляет 3741 п. н., а для белок-кодирующих генов и региона D-петли — 11619 п. н.

В результате аннотации было установлено наличие в митогеноме *M. albifrons* полного набора белок-, тРНК- и рРНК-кодирующих генов. Регион повторов и область формирования D-петли были отмечены в теоретически ожидаемой локализации (табл. 3). Дополнительно регион повторов был верифицирован путем обнаружения в нем нуклеотидных повторов, а область локализации D-петли — путем обнаружения консервативных доменов, характерных для данного участка, при анализе картины выравнивания.

Для митохондриального генома *M. albifrons* установлено наличие семнадцати случаев перекрытия генов, среди которых один общий нуклеотид встречается семь раз, три раза — по семь общих нуклеотидов у двух генов, два случая перекрытия наблюдается для трех нуклеотидов, и по одному разу присутствует перекрытие в размере двух, четырех, пяти, одиннадцати и двадцати нуклеотидов. Также между некоторыми генами обнаруживаются короткие некодирующие вставки, преимущественно от одного до семи нуклеотидов. Исключение составляют гены *Nad5*

и *his*, вставка между которыми составляет 49 нуклеотидов.

Порядок генов в митохондриальном геноме *M. albifrons* соответствует таковому у так называемой предковой формы митохондриального генома насекомых (рис. 1).

Суммарная длина всех тРНК составила 1445 п. н., с диапазоном длины в 62–75 нуклеотидов для единичных генов. Сконструированные модели для тРНК представляют собой классическую вторичную структуру «клеверного листа» (рис. 2), с характерным для насекомых отсутствием дигидроуридиновой петли в одной из двух моделей тРНК-серина. В структуре всех тРНК суммарно было обнаружено 22 случая неканонического спаривания нуклеотидов (16 случаев GU и 6 UU пар) во всех структурных частях тРНК. Обычно аминокислотный стебель у тлей наиболее консервативен по длине и составляет 7 канонических пар нуклеотидов [25], однако в митогеноме *M. albifrons* длина данной структуры варьирует, в том числе содержит нестандартные пары оснований. В митохондриальном геноме *M. albifrons* нуклеотидные пары GU и UU обнаружены в 14 из 22 тРНК. На сегодняшний день доподлинно не известно, являются ли aberrантные тРНК функциональными в митогеномах, предложен только теоретический механизм посттранскрипционного редактирования РНК [26].

Таблица 3

Структурная аннотация митохондриального генома *M. albifrons*

Название области	Продукт/функциональное назначение	Координаты в геноме	Длина, н. н.	Кодирующая цепь
Cox1	Субъединица I цитохром с оксидазы	1–1536	1536	+
leu	тРНК лейцина	1532–1599	68	+
Cox2	Субъединица II цитохром с оксидазы	1603–2274	672	+
lys	тРНК-лизина	2276–2350	75	+
asp	тРНК-аспарагиновой кислоты	2350–2412	63	+
Atp8	Субъединица VIII АТФ-синтазы F0	2422–2571	150	+
Atp6	Субъединица VI АТФ-синтазы F0	2552–3205	654	+
Cox3	Субъединица III цитохром с оксидазы	3205–3990	786	+
gly	тРНК-глицина	3990–4052	63	+
Nad3	Субъединица III НАДН-дегидрогеназы	4050–4406	357	+
ala	тРНК-аланина	4407–4470	64	+
arg	тРНК-аргинина	4470–4534	65	+
asn	тРНК-аспарагина	4535–4598	64	+
ser	тРНК-серина	4598–4659	62	+
glu	тРНК-глутаминовой кислоты	4663–4726	64	+
Rep_region	Область повторов	4727–4983	257	+
phe	тРНК-фенилаланина	4984–5048	65	–
Nad5	Субъединица V НАДН-дегидрогеназы	5049–6719	1671	–
his	тРНК-гистидина	6769–6833	65	–
Nad4	Субъединица IV НАДН -дегидрогеназы	6834–8156	1323	–
Nad4L	Субъединица IV L НАДН -дегидрогеназы	8150–8443	294	–
thr	тРНК-треонина	8442–8503	62	+
pro	тРНК-пролина	8505–8572	68	–
Nad6	Субъединица VI НАДН -дегидрогеназы	8564–9067	504	+
CytB	Цитохром B	9067–10182	1116	+
ser	тРНК-серина	10191–10255	65	+
Nad1	Субъединица I НАДН -дегидрогеназы	10266–11201	936	–
leu	тРНК-лейцина	11202–11266	65	–
rrnL	16S рРНК	11260–12527	1268	–
val	тРНК-валина	12527–12590	64	–
rrnS	12S рРНК	12603–13373	771	–
D-loop	Область D-петли	13374–14021	648	
ile	тРНК-изолейцина	14022–14085	64	+
gln	тРНК-глутамина	14083–14148	66	–
met	тРНК-метионина	14158–14223	66	+
Nad2	Субъединица II НАДН -дегидрогеназы	14224–15201	978	+
trp	тРНК-триптофана	15198–15267	70	+
cys	тРНК-цистеина	15257–15325	69	–
tyr	тРНК-тирозина	15329–15394	66	–

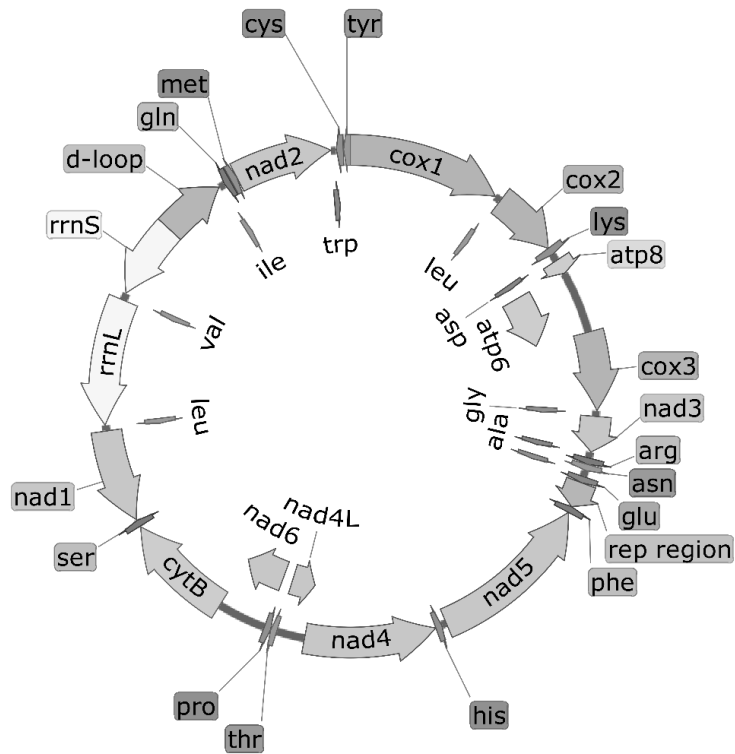


Рис. 1. Карта митохондриального генома *M. albifrons*

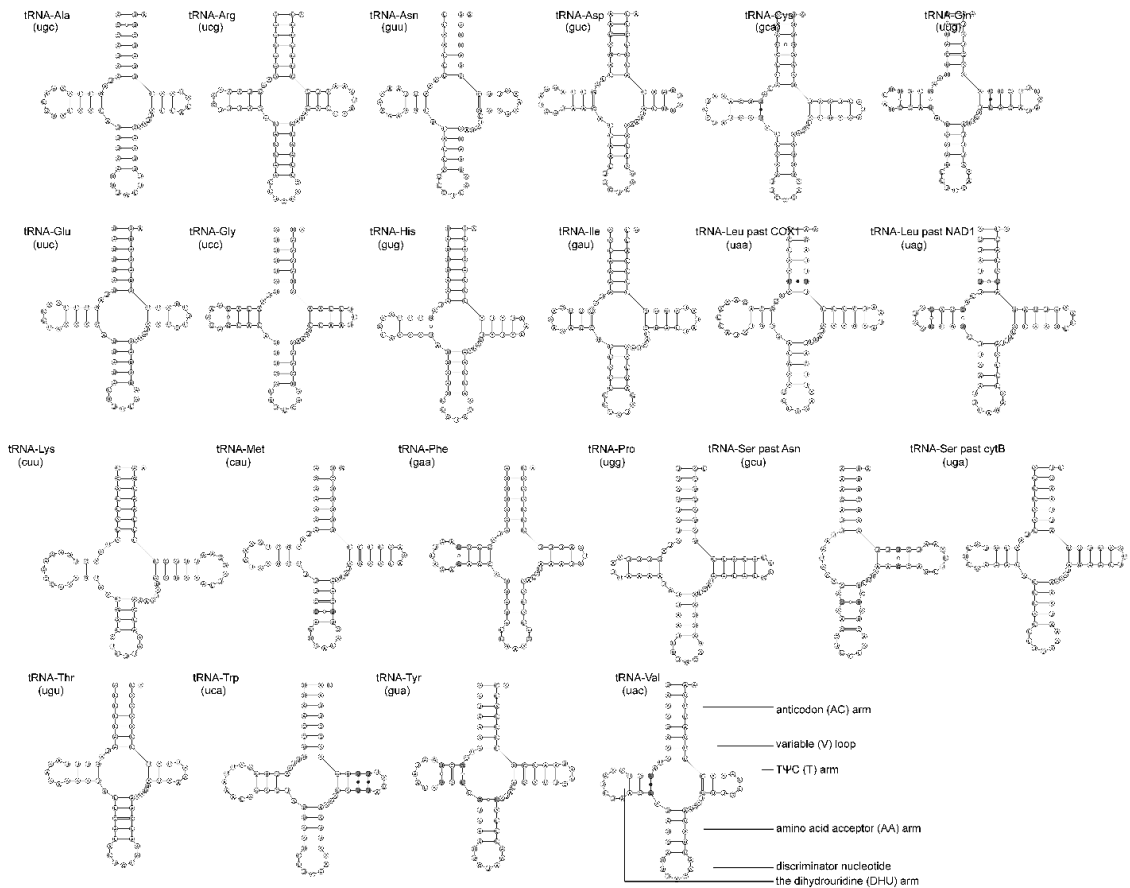


Рис. 2. Вторичная структура тРНК *M. albifrons*

Заключение

Анализ структурного состава митохондриального генома *M. albifrons* показал, что митогеном данного вида тли обладает предковой, или классической, структурой. Нуклеотидный состав генома в отношении содержания АТ-нуклеотидов смещена в сторону аденина по причине высокого содержания адениновых оснований в регионе повторов (57,2%). В митохондриальном геноме *M. albifrons* присутствует полный набор тРНК.

Список использованных источников

1. Buga, S. V. Aphids of the tribe Macrosiphini (Insecta: Homoptera: Aphididae) in Belarus. / S. V. Buga, A. V. Stekolshchikov // Zoosystematica Rossica. – 2012. – Vol. 21, № 1. – P. 63–96.
2. Вирусные болезни люпина и меры борьбы с ними / А. Л. Амбросов [и др.]; Белорус. НИИ защиты растений. – Минск: Ураджай, 1985. – 77 с.
3. Жоров, Д. Г. Инвазивные виды гемиптероидных насекомых (Insecta: Hemipteroidea) Беларуси (таксономический состав, экологические группы, географическое распространение, биологические основы вредоносности): автореф. ... дис. канд. биол. наук: 03.02.05 / Д. Г. Жоров; БГУ. – Минск, 2017. – 25 с.
4. Буга, С. В. Современные тренды динамики географического распространения на территории Беларуси инвазивных видов беспозвоночных-фитофагов/С. В. Буга, Д. Г. Жоров, О. В. Синчук // Земледелие и защита растений. – 2016. – № 3. – С. 34–37.
5. Phylogenetic relationship and characterization of the complete mitochondrial genome of the black citrus aphid, *Aphis aurantii* (Hemiptera: Aphididae) / Y. Wang [et al.] // Mitochondrial DNA Part B. – 2019. – Vol. 4, № 2. – P. 3567–3568.
6. Molecular evolutionary trends and feeding ecology diversification in the Hemiptera, anchored by the milkweed bug genome / K. A. Panfilio [et al.] // Genome Biol. – 2019. – Vol. 20, № 1. – P. 64.
7. The genome sequence of the grape phylloxera provides insights into the evolution, adaptation, and invasion routes of an iconic pest / C. Rispe [et al.] // BMC Biology. – 2020. – Vol. 18, № 1. – P. 90.
8. Wolstenholme, D. R. Animal Mitochondrial DNA: Structure and Evolution / D. R. Wolstenholme // International Review of Cytology. – Elsevier, 1992. – Vol. 141. – P. 173–216.
9. Boore, J. L. Animal mitochondrial genomes / J. L. Boore // Nucleic Acids Res. – 1999. – Vol. 27, № 8. – P. 1767–1780.
10. Cameron, S. L. Insect Mitochondrial Genomics: Implications for Evolution and Phylogeny / S. L. Cameron // Annu. Rev. Entomol. – 2014. – Vol. 59, № 1. – P. 95–117.
11. Deducing the pattern of arthropod phylogeny from mitochondrial DNA rearrangements / J. L. Boore [et al.] // Nature. – 1995. – Vol. 376, № 6536. – P. 163–165.
12. Doerder, F. P. Barcodes Reveal 48 New Species of Tetrahymena, Dexiostoma, and Glaucocoma: Phylogeny, Ecology, and Biogeography of New and Established Species / F. P. Doerder // Journal of Eukaryotic Microbiology. – 2019. – Vol. 66, № 1. – P. 182–208.
13. Applying plant DNA barcodes for Rosa-ceae species identification / X. Pang [et al.] // Cladistics. – 2011. – Vol. 27, № 2. – P. 165–170.
14. Barcoding for diatoms in the Yangtze River from the morphological observation and 18S rDNA polymorphic analysis / Z. Li [et al.] // Forensic Science International. – 2019. – Vol. 297. – P. 81–89.
15. Zhang H. [et al.] The First Complete Mitochondrial Genome of Lachninae Species and Comparative Genomics Provide New Insights into the Evolution of Gene Rearrangement and the Repeat Region // Insects. – 2021. – Vol. 12, № 1. – P. 55.
16. Dierckxsens, N. NOVOPlasty: de novo assembly of organelle genomes from whole genome data / N. Dierckxsens, P. Mardulyn, G. Smits // Nucleic Acids Research. – 2017. – Vol. 45, № 4. – P. e18.
17. Laslett, D. ARWEN: a program to detect tRNA genes in metazoan mitochondrial nucleotide sequences / D. Laslett, B. Canback // Bioinformatics. – 2008. – Vol. 24, № 2. – P. 172–175.
18. Darty, K. VARNA: Interactive drawing and editing of the RNA secondary structure / K. Darty, A. Denise, Y. Ponty // Bioinformatics. – 2009. – Vol. 25. – P. 1974–1975.
19. Benson, G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences / G. Benson //

Nucleic Acids Research. – 1999. – Vol. 27, № 2. – P. 573–580.

20. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms / S. Kumar [et al.] // Molecular Biology and Evolution. – 2018. – Vol. 35, № 6. – P. 1547–1549.

21. Zhang, B. [et al.] The mitochondrial genome of the Russian wheat aphid *Diuraphis noxia*: Large repetitive sequences between trnE and trnF in aphids // Gene. – 2014. – Vol. 533, № 1. – P. 253–260.

22. Chen, J. [et al.] The mitochondrial genome of *Greenidea psidii* van der Goot (Hemiptera: *Aphididae*) and comparisons with other *Aphididae* aphids // Int J Biol Macromol. – 2019. – Vol. 122 – P. 824–832.

23. Mao, M. [et al.] The complete mitochondrial genome of *Macrostes quadrilineatus* (Hemiptera: *Cicadellidae*) // null. – 2017. – Vol. 2, № 1. – P. 173–175.

24. Wu F. [et al.] The complete mitochondrial genome sequence of *Diaphorina citri* (Hemiptera: *Psyllidae*) // Mitochondrial DNA Part B. – 2016. – Vol. 1, № 1. – C. 239–240.

25. Wang, Y. [et al.] Comparative Analysis of Mitochondrial Genomes of Five Aphid Species (Hemiptera: *Aphididae*) and Phylogenetic Implications // PLOS ONE. – 2013. – Vol. 8, № 10. – P. e77511.

26. Schneider, A. Mitochondrial tRNA import: are there distinct mechanisms? // Trends Cell Biol. – 2000. – Vol. 10, № 12. – P. 509–513.

S. S. Levykina, N. V. Voronova, Y. V. Bandarenka

MITOCHONDRIAL GENOME STRUCTURE OF *MACROSIPHUM ALBIFRONS* ESSIG, 1911 — A DANGEROUS PEST OF LUPINE

Belarusian State University
4 Nezavisimosty Ave., 220030 Minsk, Belarus
e-mail: nvoronova@bsu.by

This work provides information on the assembly, annotation, and results of the structural analysis of the *Macrosiphum albifrons* mitochondrial genome. The mitochondrial genome of *M. albifrons* has an ancestral ability and a deviation towards the content of adenine bases in their saturation region of repeats. The presence of a complete set of tRNAs was shown, in 14 of which the paired bases are aberrant.

Keywords: aphids, mitochondrial genome, *Macrosiphum albifrons*, annotation, tRNA.

Дата поступления статьи: 1 марта 2021 г.

Р. С. Шулинский, Ю. В. Бонадаренко, Н. В. Воронова

ГЕНЫ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ В ГЕНОМЕ ТЛИ *APHIS CRACCIVORA* KOCH, 1854

Белорусский государственный университет
Республика Беларусь, 220030, г. Минск, пр-т Независимости, 4
e-mail: nvoronova@bsu.by

Результаты секвенирования, аннотации и анализа митохондриального генома *Aphis fabae mordvilkoii* приведены в настоящей работе. Показано, что мтДНК *A. fabae mordvilkoii* имеет типичные для тлей структуру и размер и не несет перестроек, обнаруженных в других известных митохондриальных геномах тлей рода *Aphis* L.

Ключевые слова: *Aphis craccivora*, тли, гены иммунной системы.

Введение

В процессе жизни тли сталкиваются с многочисленными неблагоприятными условиями внешней среды, включая инвазии различными паразитами и паразитоидами, такими как наездники, которые откладывают яйца в тела своих хозяев, а также с большим спектром вирусных, бактериальных и грибковых патогенов. Вышеуказанные патогены и паразитоиды вызывают значительное снижение численности природных популяций тлей, что указывает на их потенциальную пригодность в качестве агентов для контроля численности вредителей экономически значимых культур. Однако, насекомые имеют ряд защитных механизмов. Во-первых, многие насекомые, в том числе тли, имеют особые поведенческие реакции избегания хищников, патогенов и стрессовых факторы окружающей среды. В случае невозможности избежать индукторов стресса, дополнительную защиту оказывает кутикула и рН кишечника, неблагоприятный для многих чужеродных организмов. В случае, если эти барьеры не срабатывают, механизмы иммунной системы распознают чужеродные агенты, вызывая запуск специфических сигнальных каскадов и синтез молекул — регуляторов ответа. Имелось представление, что у насекомых не развит адаптивный специфический механизм ответа на проникновение антигенов, типичный для позвоночных, хотя имеются врожденные иммунные реакции,

такие как свертывание гемолимфы, фагоцитоз, инкапсуляция патогена и сверхпродукция антимикробных веществ. Фагоцитоз и инкапсуляция характеризуются как клеточные реакции, поскольку они опосредуются клетками гемолимфы. Иммунный ответ варьируется в зависимости от чужеродного агента и может вызывать повышенную экспрессию генов синтеза антимикробных пептидов, в случае заражения бактериями, или инициацию инкапсуляции, которая является основным видом защиты в случае борьбы с крупными чужеродными агентами, такими как паразитоиды. Однако на сегодняшний день появляется все больше доказательств способности насекомых реализовывать специфический иммунный ответ.

Первым шагом в изучении иммунитета тлей и построении модели механизма защиты от биотических стрессовых факторов является поиск соответствующих генов, их подробный доменный и сравнительный анализ, что позволит улучшить понимание работы основных сигнальных путей ответа.

Первым модельным объектом для секвенирования и изучения генома тлей стала гороховая тля *Acyrtosiphon pisum* (The International Aphid Genomics Consortium, 2010). До того, как стала доступна последовательность генома гороховой тли, был проведен экспериментальный скрининг генов, связанных с иммунитетом этого вида, с использованием метода супрессивной

субтрактивной гибридизации (SSH). Он был использован для идентификации иммуноиндуцируемых генов у насекомых, для которых нет доступных геномных ресурсов, и выявил новые и уже известные гены с новыми функциями в работе иммунитета (Altincicek and Vilcinskas 2007, Vogel et al. 2011). Например, анализ SSH и биоинформатический анализ позволили идентифицировать ген, кодирующий противогрибковый пептид тауматин, в лилейной трещалке (*Lilioceris lili*), хотя тот же самый ген не был детектирован во время исследования генома (Altincicek et al. 2008). У гороховой тли SSH выявил много дифференциально экспрессируемых генов иммунной системы, но ни один из них не был гомологичен антибактериальным белкам (AMP), обнаруженным у других насекомых. Кроме того, не выявлялось активности против живых бактерий в образцах гемолимфы *A. pisum*. Последующий биоинформационный анализ генома гороховой тли подтвердил отсутствие антибактериальных последовательностей AMP, гомологичных таковым у других насекомых, и наличие трех индуцибельных генов, кодирующих лизоцимы (Gerardo et al. 2010). Один из этих генов кодировал лизоцим с-типа, тогда как другие кодировали лизоцимы i-типа, экспрессия которых имела высокий уровень в определенных тканях. Таким образом, немецкие ученые пришли к выводу, что антибактериальные AMP были потеряны во время эволюции тли, потому что, например, дефензины обнаруживаются даже у древних насекомых, таких как *Thermobia domestica* (Altincicek and Vilcinskas 2007). Кроме того, другие виды гемиптероидных насекомых также обладают иммуноиндуцируемыми AMP, включая дефензины, в том числе *Pyrrhocoris apterus* (Cociancich et al. 1994) и *Rhodnius prolixus* (Ursic-Bedoya and Lowenberger 2007). Дополнительный биоинформатический анализ генома гороховой тли показал, что эволюционные потери простирались за пределы известных антибактериальных AMPs и включали другие гены, которые считались необходимыми для распознавания микробов и передачи сигналов, связанных с иммунитетом. Комбинированные аннотации генов и функциональный

анализ подтвердили наличие некоторых сигнальных путей, связанных с иммунитетом насекомых, таких как пути Toll и JAK/STAT, тогда как сигнальный путь IMD и белки распознавания пептидогликанов отсутствовали (Gerardo et al. 2010).

В то время как большая часть антибактериальных систем ответа у тлей утеряна, другие гены, связанные с иммунитетом, которые не распространены среди насекомых, не только присутствуют в тлях, но и имеют разнообразный характер, и, по-видимому, дифференцированно регулируются во время иммунных реакций. Например, геном гороховой тли кодирует пять членов семейства факторов, ингибирующих миграцию макрофагов (MIF), которые являются ключевыми регуляторами врожденных иммунных реакций у позвоночных (Dubreuil et al. 2014). Пептидогликановые рецепторные белки связываются с пептидогликанами на клеточных стенках грамположительных и грамотрицательных бактерий и, таким образом, позволяют иммунной системе воспринимать вторгающиеся бактерии. Они были обнаружены во всех секвенированных геномах насекомых, за исключением тли (Gerardo et al. 2010). Напротив, геном *A. pisum* содержит два гена, кодирующих грамотрицательные связывающие белки (GNBP), которые, несмотря на их название, также ответственны за восприятие грамположительных бактерий.

Материалы и методы

Имаго *A. craccivora* были коллектированы кандидатом биологических наук Д. Г. Жоровым в 2016 г. с *Robinia pseudoacacia* L. на территории Беларуси (N 54.204018; E 27.854417). Видовая принадлежность тлей была определена Д. Г. Жоровым по морфологическим ключам и подтверждена результатами ДНК-штрихкодирования, а именно — анализом участка гена субъединицы 1 цитохром-оксидазы с (COI), соответствующего фрагменту Фолмера.

Образцы, предназначенные для выделения ДНК, непосредственно после сбора помещали в 96% этанол и в морозильную камеру с температурой -20°C . ДНК выделяли с использованием коммерческого на-

бора «Blood-Animal-Plant DNA Preparation Kit» (Jena Bioscience, ФРГ) в соответствии с протоколом производителя. Замороженную тотальную ДНК отправляли в компанию Macrogen для приготовления библиотек и секвенирования.

Геном *A. craccivora* был секвенирован компанией Macrogen (Республика Корея), передан в виде не подвергнутых какой-либо обработке данных. Полногеномное секвенирование *A. craccivora* было проведено на MiSeq с использованием библиотеки TruSeq 350. Объем полученных данных составил 45 GB, что соответствует примерно 100-кратному покрытию генома.

При процессинге прочтений были проведены оценка качества прочтений и тримминг некачественных оснований в FastQC и Trimmomatic соответственно. Фильтрация эукариотических прочтений проводилась путем маппинга по всем бактериальным геномам, доступных в RefSeq в программе Bowtie2 (sensitive local alignment) с последующим отбором невыравненных прочтений. Для работы с форматами нуклеотидных данных использовались samtools и bedtools. Далее полученные прочтения использовали для сборки в ассемблере AbySS2.0 (алгоритм нахождения Эйлерового пути в графах де Брейна для генерации контиг). Подбор k-мера осуществлялся эвристически. Оценку качества сборок проводили в Quast.

Аннотация проводилась в пайплайне Maker. Использовалась итеративная стратегия обучения скрытых марковских моделей. Первым этапом являлось обучение скрытых марковских моделей в программе snar на

моделях генов, полученных в результате выравнивания EST *A. craccivora* [SRR768515]. Далее предсказанные модели snar использовались для переобучения snar, а также AUGUSTUS. В качестве самообучающегося HMM предиктора был выбран genemark HMM. Для предсказания генных моделей по белковой гомологии использовали транслированные CDS геномов тлей, доступных в RefSeq (табл. 1).

Оценка качества структурной аннотации была проведена в программах SEGMA и Busco. Финальные модели генов синтезировались как консенсусные с HMM предсказаний, а также EST и белковой гомологии в программе Glean. Для проведения функциональной аннотации вышеуказанный набор генов идентифицировали выравниванием и HMM анализом с использованием баз данных UniRef, RefSeq, KEGG Ontology, InterPro, PFAM, Gene Ontology.

Аннотацию генов иммунной системы проводили следующим образом: был получен полный список генов модельного для тлей вида *A. pisum*, из которого была сформирована локальная база данных BLAST, а также проведен анализ на наличие доменов InterPro. Далее мы извлекали гены из генома *A. craccivora*, содержащие функциональные домены генов иммунной системы *A. pisum*, а также те, которые имели высокий процент идентичности и низкое значение e-value с вышеуказанными генами. Аннотация извлеченных генов была дополнительно курирована в WebApollo с последующим установлением роли относительно гомологии к референсным последовательностям.

Таблица 1

Геномы тлей, использованные для аннотации

Вид	Код доступа в RefSeq
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	GCF_005508785.1
<i>Aphis gossypii</i>	GCF_004010815.1
<i>Rhopalosiphum maidis</i>	GCF_003676215.2
<i>Diuraphis noxia</i>	GCF_001186385.1
<i>Myzus persicae</i>	GCF_001856785.1
<i>Sipha flava</i>	GCF_003268045.1
<i>Melanaphis sacchari</i>	GCF_002803265.2

Результаты и обсуждение

Создана база данных аннотированных генов иммунного ответа с классификацией по таким функциям, как «ответ», «сигнализация», «распознавание». В геноме *A. craccivora* об-

наружено 72 гена, которые предположительно играют ключевые роли в иммунном ответе вышеуказанных насекомых. Результаты аннотации генов данной группы приводятся в таблицах ниже.

Таблица 2

Гены иммунной системы *A. craccivora* группы сигнализации

Название гена	Описание гена	Идентификационный номер в геноме <i>A. craccivora</i>	Функция
Inhibitor of apoptosis 2	Транспортин-3	AC13484-RA	imd сигнальный путь
TGF-activated kinase 1	Белок, содержащий повтор armadillo	AC11916-RA	imd сигнальный путь
TAK1-associated Binding Protein 2	Неохарактеризованный белок	AC04076-RA	imd сигнальный путь
immune response deficiency 5	E3 ubiquitin-protein ligase mind-bomb	AC09148-RA	imd сигнальный путь
Signal-transducer and trimethylguanosine synthase	Активатор транскрипции	AC21046-RA	jak/stat сигнальный путь
Janus kinase	Неохарактеризованный белок	AC07119-RA	jak/stat сигнальный путь
domeless 1	Рецептор цитокинов	AC07099-RA	jak/stat сигнальный путь
domeless 4	Рецептор цитокинов	AC08020-RA	jak/stat сигнальный путь
eiger	protein eiger	AC05976-RA	Jnk сигнальный путь
Jun-related antigen	Транскрипционный фактор AP-1	AC10366-RA	jnk сигнальный путь
basket	stress-activated protein kinase JNK	AC03073-RA	jnk сигнальный путь
hemipterous	Неохарактеризованный белок	AC05865-RA	jnk сигнальный путь
TNF-receptor-associated factor 1	TNF рецептор ассоциированный фактор	AC10934-RA	toll сигнальный путь
myeloid differentiation primary response gene	Сукцинат дегидрогеназа	AC19930-RA	toll сигнальный путь
Pellino	Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин L	AC01180-RA	toll сигнальный путь
spatzle1Bii	Белок spatzle	AC13642-RA	toll сигнальный путь
spatzle 6	Неохарактеризованный белок	AC13376-RA	toll сигнальный путь
spatzle 2	основной спираль-петля-спираль нейронный транскрипционный фактор TAP	AC19769-RA	toll сигнальный путь
dorsal	Белок эмбрионной полярности	AC22322-RA	toll сигнальный путь
tube	Гидростероид дегидрогеназа	AC11531-RA	toll сигнальный путь
spatzle 4	Эукариотический фактор инициации трансляции	AC10609-RA	toll сигнальный путь

Продолжение таблицы 2

Название гена	Описание гена	Идентификационный номер в геноме <i>A. craccivora</i>	Функция
cactus	Стресс-индуцируемый фосфопротеин	AC04317-RA	toll сигнальный путь
cactin	Неохарактеризованный белок	AC10982-RA	toll сигнальный путь
pelle	retinoblastoma protein 1	AC06225-RA	toll сигнальный путь
spatzle1-5	Неохарактеризованный белок	AC07272-RA	toll сигнальный путь
spatzle1-3	F-box белок	AC04429-RA	toll сигнальный путь
spatzle3	Белок spaetzle	AC22292-RA	toll сигнальный путь
Toll-like	Неохарактеризованный белок	AC15553-RA	несколько toll функций в toll сигнальном пути
Toll-like	Неохарактеризованный белок	AC20055-RA	несколько toll функций в toll сигнальном пути
Tollo	toll рецептор Tollo	AC00278-RA	несколько toll функций в toll сигнальном пути
Toll-6	toll рецептор 6	AC18024-RA	несколько toll функций в toll сигнальном пути
Toll-like	toll рецептор 6	AC20426-RA	несколько toll функций в toll сигнальном пути
18 wheeler	toll рецептор 7	AC05856-RA	несколько toll функций в toll сигнальном пути

Гены группы сигнализации представляют собой самую обширную группу генов иммунного ответа в геноме *A. craccivora*. В ходе аннотации было установлено наличие 33 генов группы сигнализации, среди которых 21 — гены toll сигнального пути, причем 6 из них выполняют одновременно несколько функций, 4 — jnk пути, 4 — imd пути и 4 принадлежат jak/stat пути.

Исходя из результатов аннотации, при осуществлении неспецифического иммунного ответа в виде деградации микробных и грибковых агентов *A. craccivora* использует различные семейства хитиназ и лизоцимов. Причем преимущественно были обнаружены гены для неспецифического ответа на грибковые инвазии.

В геноме *A. craccivora* было обнаружено 6 генов, функция которых заключается в распознавании бактериальных и грибковых патогенов и их паттернов, с преимущественным распознаванием первых. Данная группа преимущественно состоит из генов лектинов, обладающие способностью высокоспецифично связывать остатки углеводов

на поверхности клеток, в частности, вызывая их агглютинацию.

Было установлено наличие 14 генов теплового шока, активирующихся при ответе на общий стресс, в частности, при повышении температуры. Также в геноме *A. craccivora* присутствует 2 гена, кодирующих ферменты профенолоксидазы, ответственных за общий окислительный стресс путем инактивации фенольных соединений.

Среди оставшихся из установленных в ходе аннотации гены выполняют различные функции, такие как маркирование патогенов для фагоцитоза, продуцирование оксида азота, срочная продукция феромонов. Также был обнаружен ген, кодирующий антимикробный пептид, и несколько генов, предположительно выполняющих несколько ролей.

Среди данной группы генов самыми многочисленными являются гены белков теплового шока, отвечающих за общий ответ на стресс, гены хитиназоподобных белков, отвечающих за защиту от грибов патогенов, а также больше количество рецепторных белков toll пути, spatzle.

Таблица 3

Гены иммунной системы *A. craccivora* группы деградации патогенов

Название гена	Описание гена	Идентификационный номер в геноме <i>A. craccivora</i>	Функция
Chitinase-like protein 1	Неохарактеризованный белок	AC05680-RA	деградация грибковых агентов
Chitinase-like protein 3	Переносчик альфа-токоферола	AC08727-RA	деградация грибковых агентов
Chitinase-like protein 7	Митохондриальная эндонуклеаза G	AC16307-RA	деградация грибковых агентов
Chitinase-like protein 4	nose resistant to fluoxetine protein 6	AC13465-RA	деградация грибковых агентов
Chitinase-like protein 6	Хитиназа 3	AC03668-RA	деградация грибковых агентов
Chitinase-like protein 5	Гистон деацетилаза	AC10728-RA	деградация грибковых агентов
Chitinase-like protein 2	Хитиназа 10	AC07066-RA	деградация грибковых агентов
Lysozyme	Тестикулярный белок i-типа	AC21415-RA	деградация микробных агентов
Lysozyme	Тестикулярный белок i-типа	AC21414-RA	деградация микробных агентов
Lysozyme	Тестикулярный белок i-типа	AC21416-RA	деградация микробных агентов

Таблица 4

Гены иммунной системы *A. craccivora*, группы распознавания патогенов

Название гена	Описание гена	Идентификационный номер в геноме <i>A. craccivora</i>	Функция
C-type Lectin selectin-like	sushi von Willebrand factor type A EGF and pentraxin domain-containing protein 1	AC16016-RA	распознавание бактериального патогена
C-type Lectin 1	Белок целевого латерального сигналинга	AC07866-RA	распознавание бактериального патогена
C-type Lectin 3	GATOR комплекс белка DEPDC5	AC14363-RA	распознавание бактериального патогена
C-type Lectin galactose-binding	Цинковые пальцы	AC21088-RA	распознавание бактериального патогена
Gram Negative Binding Protein 1	Пептидил-пролил цис-транс изомераза	AC11406-RA	распознавание грибковых и бактериальных паттернов
Gram Negative Binding Protein 2	nicotinamide/nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase 1 Мононуклеотид аденил трансфераза никотинамида/никотиновой кислоты	AC15815-RA	распознавание грибковых и бактериальных паттернов

Таблица 5

Гены иммунной системы *A. craccivora* группы общего ответа

Название гена	Описание гена	Идентификационный номер в геноме <i>A. craccivora</i>	Функция
Heat shock protein 83	heat shock protein 83 salivary gland	AC22530-RA	ответ на общий стресс
Heat shock protein 90	mitochondrial dimethyladenosine transferase 1	AC21126-RA	ответ на общий стресс
Heat shock protein 14	heat shock 70 kDa protein 14-A	AC17746-RA	ответ на общий стресс
Heat shock protein 21.4	alpha-crystallin B chain	AC10003-RA	ответ на общий стресс
Heat shock cognate 70 - Cb	NADH dehydrogenase	AC01214-RA	ответ на общий стресс
Heat shock cognate 5	stress-70 protein mitochondrial	AC05142-RA	ответ на общий стресс
Heat shock cognate 70 - 2	heat shock 70 kDa protein cognate 4	AC00925-RA	ответ на общий стресс
Heat shock cognate 70	endoplasmic reticulum chaperone BiP	AC19161-RA	ответ на общий стресс
Heat shock protein 70Ab	peroxisomal multifunctional enzyme type 2	AC03898-RA	ответ на общий стресс
Heat shock protein 70Ba	pancreatic triacylglycerol lipase	AC03840-RA	ответ на общий стресс
Heat shock protein 70Aa	Неохарактеризованный белок	AC06809-RA	ответ на общий стресс
Heat shock protein 60	Неохарактеризованный белок	AC08463-RA	ответ на общий стресс
Heat shock protein 83	heat shock protein 83	AC18418-RA	ответ на общий стресс
Heat shock protein 90	endoplasmin homolog	AC22660-RA	ответ на общий стресс
Prophenoloxidase 1	4-coumarate--CoA ligase 1	AC07080-RA	ответ на фенолоксидазу
Prophenoloxidase 2	phenoloxidase 2	AC20518-RA	ответ на фенолоксидазу

Таблица 6

Гены иммунной системы *A. craccivora* с различными функциями

Название гена	Описание гена	Идентификационный номер в геноме <i>A. craccivora</i>	Функция
Thiolester containing protein III	partial CD109 antigen	AC07571-RA	маркирование патогенов для фагоцитоза
Nitric oxide synthase	nitric oxide synthase	AC05444-RA	продуцирование оксида азота
Thaumatoin6	KRAB-A domain-containing protein 2	AC05909-RA	антимикробный пептид
galectin 2	interferon-inducible double-stranded RNA-dependent protein kinase activator A homolog Интерферон индуцируемый гомолог активатора РНК-зависимой протеин киназы	AC06683-RA	было предположено несколько ролей
galectin 1	Галектин	AC21807-RA	было предположено несколько ролей
Isoprenyl diphosphate synthase	Фарнезил пирофосфат синтаза	AC18797-RA	срочная продукция феромонов

Заклучение

В геноме *A. craccivora* было обнаружено 72 гена иммунной системы. Из них 33 — гены группы сигнализации, 10 генов группы деградации патогенов, 6 генов группы распознавания патогенов и 16 генов группы общего стресса. Иммунная система вышеуказанного вида характеризуется обширной системой сигнализации в совокупности с преимущественно механизмами неспецифического иммунного ответа.

Работа выполнена при поддержке гранта БРФФИ (Договор № Б20М-117 от 04.05.2020).

Список использованных источников

1. Introduction to aphid species file [Electronic resource] / C. Favret, D. C. Eades. – 2009. – Mode of access: <http://Aphid.SpeciesFile.org> – Date of access: 26.07.2018.
2. Nafria, J. M. N. Update to the Registers of family-group and genus-group taxa of Aphidoidea (Hemiptera, Sternorrhyncha) / J. M. N. Nafria, C. Favret // Boln. Asoc. esp. Ent., – 2014. – Vol. 38, № 1. – P. 1–23.
3. Aphid Species File. Version 5.0/5.0. [Electronic resource] / C. Favret. – 2014. – Mode of access: <http://Aphid.SpeciesFile.org> – Date of access: 29.07.2018.
4. Impact of the English Grain Aphid, Sitobion avenae (F.) (Homoptera: Aphididae), on the Yield of Wheat Plants Subjected to Water Deficits / A. Fereres [et al.] // Environmental Entomology. – 1988. – Vol. 17, № 3. – P. 596–602.
5. Malik, Y. P. Impact of aphid (*Lipahis eyrsimi*) intensity on plant growth and seed characters of Indian mustard. / Y. P. Malik, B. Deen // Indian J. Ent. – 1998. – Vol. 24, P. 286–287.
6. Carter, C. I. Impact of green spruce aphid on growth: Can a tree forget its past? / C. I. Carter // Forestry Commission Research and Development Paper. – 1977. – Vol. 116, P. 1–8.
7. Blackman, R. L. Aphids on the world's crops: an identification and information guide. / R. L. Blackman, V. F. Eastop // Wiley, John & Sons, Incorporated. – 476 p.
8. Weber, G. Genetic variability in host plant adaptation of the green peach aphid, *Myzus persicae* / G. Weber // Entomologia Experimentalis et Applicata. – 1985. – Vol. 38, № 1. – P. 49–56.
9. Cardoza, Y. J. Phloem Alkaloid Tolerance Allows Feeding on Resistant *Lupinus angustifolius* by the Aphid *Myzus persicae* / Y. J. Cardoza [et al.] // Journal of Chemical Ecology. – 2006. – Vol. 32, № 9. – P. 1965–1976.
10. Jermy, T. Evolution of Insect Host Plant Relationships / T. Jermy // The American Naturalist. – 1984. – Vol. 124, № 5. – P. 609–630.
11. Powell, G. Host plant selection by aphids: behavioral, evolutionary, and applied perspectives / G. Powell, C. R. Tosh, J. Hardie // Annual Review of Entomology. – 2006. – Vol. 51, № 1. – P. 309–330.
12. Evolutionary history of aphid-plant associations and their role in aphid diversification / J. Peccoud [et al.] // Comptes Rendus Biologies. – 2010. – Vol. 333, № 6–7. – P. 474–487.
13. Berim, M. N. *Aphis fabae Scopoli – Black Bean Aphid, 2009* / M. N. Berim // Interactive Agricultural Ecological Atlas of Russia and Neighboring Countries. / Available from: <http://www.agroatlas.ru>.
14. Black bean aphid. [Electronic resource] / Rothamsted Insect Research. Rothamsted Research. / Mode of access: <http://www.agroatlas.ru> – Date of access: 01.03.2013.
15. Fauna Europaea – all European animal species on the web / Y. de Jong [et al.] // Biodiversity Data Journal. – 2014. – Vol. 2. – 4034 p.
16. A review of the pharmacological effects of *Arctium lappa* (burdock) / Y.S. Chan [et al.] // Inflammopharmacology. – 2011. – Vol. 19, № 5. – P. 245–254.
17. Huang, X. L. Aphids as models for ecological and evolutionary studies: Aphids as models for ecological and evolutionary studies / X. L. Huang, G. X. Qiao // Insect Science. – 2014. – Vol. 21, № 3. – P. 247–250.
18. The mitochondrial genome sequence of the Tasmanian tiger (*Thylacinus cynocephalus*) / W. Miller [et al.] // Genome Res. – 2009. – Vol. 19. – P. 213–220.
19. Broughton, R. E. The complete sequence of the zebrafish (*Danio rerio*) mitochondrial genome and evolutionary patterns in vertebrate mitochondrial DNA / R. E. Broughton, J. E. Milam, B. A. Roe // Genome Res. – 2001. – Vol. 11. – P. 1958–1967.
20. The complete sequence of the mitochondrial genome of the crustacean *Penaeus monodon*: are malacostracan crustaceans more closely related to

- insects than to branchiopods? / K. Wilson [et al.] // *Mol. Biol. Evol.* – 2000. – Vol. 17. – P. 863–874.
21. The complete mitochondrial genome of the bag-shelter moth *Ochrogaster lunifer* (Lepidoptera, Notodontidae) / P. Salvato [et al.] // *BMC Genomics.* – 2008. – Vol. 9, № 1. – P. 331.
22. Wolstenholme, D. R. *Animal Mitochondrial DNA: Structure and Evolution* / D.R. Wolstenholme // *International Review of Cytology.* – Elsevier, 1992. – Vol. 141. – *Animal Mitochondrial DNA.* – P. 173–216.
23. Boore, J. L. *Animal mitochondrial genomes* / J. L. Boore // *Nucleic Acids Res.* – 1999. – Vol. 27, № 8. – P. 1767–1780.
24. Comparative and phylogenomic studies on the mitochondrial genomes of Pentatomomorpha (Insecta: Hemiptera: Heteroptera) / J. Hua [et al.] // *BMC Genomics.* – 2008. – Vol. 9. – P. 610.
25. The Complete Mitochondrial Genome of the Damsel Bug *Alloeorhynchus bakeri* (Hemiptera: Nabidae) / H. Li [et al.] // *International Journal of Biological Sciences.* – 2012. – Vol. 8, № 1. – P. 93–107.
26. Complete mitochondrial genome of *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) / S. Zhang [et al.] // *Mitochondrial DNA.* – 2016. – Vol. 27, № 2. – P. 854–855.
27. All 37 Mitochondrial Genes of Aphid *Aphis craccivora* Obtained from Transcriptome Sequencing: Implications for the Evolution of Aphids / N. Song [et al.] // *Plos One.* – 2016. – Vol. 11, № 6. – P. 97–103.
28. Comparison of complete mitochondrial DNA sequences between old and new world strains of the cowpea aphid, *Aphis craccivora* (Hemiptera: Aphididae) / W. Sun [et al.] // *Agri Gene.* – 2017. – Vol. 4. – P. 23–29.
29. Laslett, D. ARWEN: a program to detect tRNA genes in metazoan mitochondrial nucleotide sequences / D. Laslett, B. Canback // *Bioinformatics.* – 2008. – Vol. 24, № 2. – P. 172–175.
30. Kumar, S. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets / S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura // *Molecular Biology and Evolution.* – 2016. – Vol. 33, № 7. – P. 1870–1874.
31. Miquel, J. An update on the mitochondrial-DNA mutation hypothesis of cell aging / J. Miquel // *Mutation Research/DNAging.* – 1992. – Vol. 275, № 3–6. – P. 209–216.
32. Cameron, S. L. *Insect Mitochondrial Genomics: Implications for Evolution and Phylogeny* / S. L. Cameron // *Annual Review of Entomology.* – 2014. – Vol. 59, № 1. – P. 95–117.
33. Wang, Y. Comparative Analysis of Mitochondrial Genomes of Five Aphid Species (Hemiptera: Aphididae) and Phylogenetic Implications / Y. Wang, X. L. Huang, G. X. Qiao // *Plos One.* – 2013. – Vol. 8, № 10. – P. 77511.
34. Ren, Z. M. Complete mitochondrial genome of the North American Rhus gall aphid *Melaphis rhois* (Hemiptera: Aphididae: Eriosomatinae) / Z. M. Ren, J. Wen // *Mitochondrial DNA Part B.* – 2017. – Vol. 2, № 1. – P. 169–170.
35. New Views on Strand Asymmetry in Insect Mitochondrial Genomes / S.J. Wei [et al.] // *Plos One.* – 2010. – Vol. 5, № 9. – P. 12708.
36. Complete nucleotide sequence and organization of the mitochondrial genome of *Sirthea flavipes* (Hemiptera: Reduviidae: Peiratinae) and comparison with other assassin bugs / J. Gao [et al.] // *Zootaxa.* – 2013. – Vol. 3669, № 1. – P. 1.

R. S. Shulinsky, Y. V. Bandarenka, N. V. Voronova

IMMUNE SYSTEM GENES IN THE *APHIS CRACCIVORA* KOCH, 1854 GENOME

Belarusian State University
4 Nezavisimosty Ave., 220030 Minsk, Belarus
e-mail: nvoronova@bsu.by

Sequencing results, annotation, and analysis of the mitochondrial genome of *Aphis fabae mordvilkoii* are demonstrated in this work. It was shown that mtDNA of *Aphis fabae mordvilkoii* has a structure and size typical of aphids and does not carry any rearrangements identified in other known mitochondrial genomes of aphids of the genus *Aphis* L.

Keywords: *Aphis craccivora*, aphids, immune system genes.

Дата поступления статьи: 1 марта 2021 г.

Л. В. Можаровская

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИОННОЙ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ ПРОРОСТКОВ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ В УСЛОВИЯХ ХОЛОДОВОГО СТРЕССА

Государственное научное учреждение
«Институт леса Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь, 246050, г. Гомель, ул. Пролетарская, 71
e-mail: milamozh@yandex.by

На основе данных высокопроизводительного секвенирования транскриптомов проростков сосны обыкновенной идентифицированы гены, характеризующиеся индуцированной экспрессионной активностью в условиях холодного стресса: *xth1*, *epla*, *sams*, *samdc*, *aqp*, *aaa+*, *crt*, *bi-1*, *act*, *a/b-tub*, *adf*, *ss/af* и *pr-3*. Полученные данные могут быть использованы для формирования набора генов-кандидатов для диагностики как физиологического состояния, так и холодоустойчивых генотипов сосны обыкновенной на стадии проростков.

Ключевые слова: сосна обыкновенная, высокопроизводительное секвенирование, транскриптом, холодный стресс, гены устойчивости.

Введение

Смена суточных температур или длительное воздействие низких положительных температур негативно сказывается на выход и качество посадочного материала сосны обыкновенной при выращивании в условиях лесных питомников, что связано со снижением общей устойчивости растений [1–3].

Под действием холодного стресса низких положительных температур у растений отмечается ингибирование биохимических и ферментных реакций, снижается мембранная активность, а в случае отрицательных температур происходит образование ледяных кристаллов, которые вызывают повреждение клеточных мембран [4]. Механизмы защиты растительных клеток от разрушения при холодном стрессе основываются на физиологических изменениях, приводящих к перестройке в липидном составе клеточных мембран, накопления моно- или олигосахаридов, синтеза метаболитов с антиоксидантными свойствами и др. [5–8]. Индуцируемые холодным стрессом гены подразделяются на две основные группы [9–11]: непосредственно активируемые холодом COR-гены (от англ. cold regulated) и белковые молекулы, участвующие в регуляции передачи сигнала и экспрессии COR-генов, в том числе их факторы транскрипции [12–14]. В литературе описано более 1000 COR-генов, индуци-

руемых холодным стрессом в том числе белки теплового шока (шапероны), LEA-белки, осмотины, антифризные белки, мРНК-связывающие белки, ферменты для биосинтеза осмолитов, белки водных каналов, ферменты детоксикации, ферменты метаболизма жирных кислот, ингибиторы протеиназы, ферритин и др. [12, 13, 15–18].

С использованием инструментов молекулярно-генетического анализа, в том числе и транскриптомов, к настоящему времени в литературных источниках представлены результаты исследований о механизмах акклиматизации хвойных древесных растений, а также об изменениях профиля экспрессии генов как к низкположительным, так и к отрицательным температурам. [19–21].

В предыдущем исследовании нами, на основе анализа относительного уровня прочтения, был установлен перечень EST-локусов превалирующих транскрипционных спектров среди ассемблированных прочтений. В данной работе, на основе анализа транскриптов групп функциональных и структурных полипептидов (CDD) GeneBank NCBI, проведен сравнительный анализ экспрессионной активности генов проростков сосны обыкновенной в условиях холодного стресса, что позволит сформировать набор генов-кандидатов для диагностики холодоустойчивых генотипов.

Материалы и методы

План проведения эксперимента включал в себя посев и выращивание семян сосны обыкновенной ($n = 26$) в лабораторных условиях при $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ и фотопериоде 10 ч. На седьмые сутки растения разделяли и выращивали при заданных температурных режимах: для контрольного варианта $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$, в условиях холодного стресса $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, при отсутствии освещенности, в течение 7 суток. Препараты мРНК получали из тканей корня и гипокотила проростков сосны обыкновенной. Высокопроизводительное секвенирование и анализ транскриптомов выполняли на базе Ion PGM Torrent (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколам, изложенным в предыдущем исследовании [22]. Нормализацию уровней экспрессии генов исследуемых транскриптомов проводили относительно одного миллиона прочтений — рассчитывали величину RPM (от англ. reads per million, RPM — прочтений на миллион) [23].

Результаты и обсуждение

В результате сборки и обобщения результатов высокопроизводительного секвенирования транскриптомов, получено 4502 и 28 611 ассемблированных последовательностей (контигов) для исследуемой и контрольной групп соответственно. После проведения аннотации транскриптомов в базе данных консервативных доменов (CDD) GeneBank NCBI установлено 3804 типов функциональных и структурных полипептидов для транскриптома группы проростков сосны обыкновенной, выращенной в условиях холодного стресса и 12445 — для контрольной группы.

В ходе последующего анализа для каждой из групп семян, на основании значений экспрессионной активности RPM, было отобрано по 45 EST-локусов, характеризующихся наибольшим уровнем экспрессии в транскриптомах. Полученные данные представлены в таблице 1. Расположение EST-локусов соответствует порядку убывания их экспрессионной активности.

Таблица 1

Перечень EST-локусов функциональных и структурных полипептидов сравниваемых групп проростков сосны обыкновенной с наибольшим уровнем экспрессии относительно одного миллиона прочтений (RPM)

№	Холодовой стресс			Контроль		
	EST-локус	детерминируемый белок	RPM	EST-локус	детерминируемый белок	RPM
1	<i>xth1</i>	ХТН1, ксилоглюкана эндотрансгликозилаза 1	9757,22	<i>cab2</i>	САВ2, хлорофилл а/б-связывающий белок фотосистемы II	11042,11
2	<i>aqp</i>	АQP, аквапорин	7836,51	<i>ub</i>	UB, убиквитин	8626,32
3	<i>ef1a</i>	EF1A, α -субъединица фактора элонгации 1	7606,02	<i>psbc</i>	PSBC, белок реакционного центра CP43 фотосистемы II	8189,47
4	<i>hsp70</i>	HSP70, белок теплового шока с молекулярной массой 70 кДа	7529,19	<i>aqp</i>	АQP, аквапорин	5847,37
5	<i>act</i>	АКТ, актин	7452,37	<i>ss/af</i>	SS/AF (EAP), белок, ассоциированный с реакциями на солевой стресс и грибную инфекцию	5291,48
6	<i>hsp90</i>	HSP90, белок теплового шока с молекулярной массой 90 кДа	7375,54	<i>psba/d</i>	PSBA/D, субъединицы D1, D2 фотосистемы II	5157,89
7	<i>ub</i>	UB, убиквитин	6376,77	<i>xth1</i>	ХТН1, ксилоглюкана эндотрансгликозилаза 1	5015,79
8	<i>cat</i>	CAT, каталаза	6223,11	<i>pr-9</i>	PR-9 (POX), секреторная пероксидаза растительного типа	4778,94
9	<i>dhn</i>	DHN, дегидрин	6223,11	<i>rps7</i>	RPS7, рибосомный белок S7 хпДНК	4352,63

Продолжение таблицы 1

№	Холодовой стресс			Контроль		
	EST-локус	детерминируемый белок	RPM	EST-локус	детерминируемый белок	RPM
10	<i>ss/af</i>	SS/AF (EAP), белок, ассоциированный с реакциями на солевой стресс и грибную инфекцию	6223,11	<i>rubiscoss</i>	RuBisCOss, малая субъединица рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы	4368,42
11	<i>samdc</i>	SAMDC, S-аденозилметионин декарбоксилаза	5531,65	<i>cat</i>	CAT, каталаза	4300,00
12	<i>acc</i>	ACC, ацетил-СоА-карбоксилаза	4686,54	<i>rps16</i>	RPS16, рибосомный белок S16 хпДНК	3852,63
13	<i>psba</i>	PSBA, субъединица D1 фотосистемы II	4609,71	<i>ef1a</i>	EF1A, α -субъединица фактора элонгации 1	3784,21
14	<i>rps16</i>	RPS16, рибосомный белок S16 хпДНК	4532,88	<i>psacre</i>	защитный белок Avr9/cf-9 (ACRE)	3715,18
15	<i>aaa+</i>	AAA+, нуклеозидтрифосфатгидролаза	4456,05	<i>ubc</i>	UBC, убиквитин-протеинлигаза	3694,74
16	<i>mcp</i>	MCP, митохондриальный транспортный белок	4379,23	<i>amp1</i>	AMP1, антимикробный пептид 1	3279,98
17	<i>sams</i>	SAMS, S-аденозилметионин синтаза	4379,23	<i>aba/wds</i>	ABA/WDS, АБК-индуцибельный белок водного стресса	3131,58
18	<i>crt</i>	CRT, кальретикулин	4225,57	<i>dhn</i>	DHN, дегидрин	3115,45
19	<i>a-tub</i>	A-TUB, α -субъединица тубулина	4225,57	<i>hsp70</i>	HSP70, белок теплового шока с молекулярной массой 70 кДа	2929,69
20	<i>asn</i>	ASN, аспарагин-синтаза	3995,08	<i>psbh</i>	PSBH, субъединица H фотосистемы II	2910,53
21	<i>pr-3</i>	PR-3, хитиназа GH19	3687,77	<i>sams</i>	SAMS, S-аденозилметионин синтаза	2884,21
22	<i>pr-9</i>	PR-9 (POX), секреторная пероксидаза растительного типа	3610,94	<i>cyp</i>	CYP, цитохром P450	2842,11
23	<i>tctp</i>	TCTP, трансляционно контролируемый опухолевый белок	3073,14	<i>mcp</i>	MCP, митохондриальный транспортный белок	2778,95
24	<i>14-3-3</i>	регуляторный 14-3-3 белок	2842,66	<i>psbk</i>	PSBK, субъединица K фотосистемы II	2636,84
25	<i>ubc</i>	UBC, убиквитин-протеинлигаза	2842,66	<i>tspa-tspf</i>	TSPA-TSPF, терпенциклаза	2589,47
26	<i>rps7</i>	RPS7, рибосомный белок S7 хпДНК	2612,17	<i>cesa</i>	CESA, целлюлоза-синтаза	2557,89
27	<i>cesa</i>	CESA, целлюлоза-синтаза	2458,51	<i>samdc</i>	SAMDC, S-аденозилметионин декарбоксилаза	2552,63
28	<i>b-tub</i>	B-TUB, β - субъединица тубулина	2458,51	<i>ms</i>	MS, метионин синтаза	2442,11
29	<i>rps2</i>	RPS2, рибосомный белок S2 хпДНК	2304,86	<i>pk</i>	PK, протеинкиназа	2431,58
30	<i>amp1</i>	AMP1, антимикробный пептид 1	2151,20	<i>acc</i>	ACC, ацетил-СоА-карбоксилаза	2378,95

Окончание таблицы 1

№	Холодовой стресс			Контроль		
	EST-локус	детерминируемый белок	RPM	EST-локус	детерминируемый белок	RPM
31	<i>rps12</i>	RPS12, рибосомный белок S12 хпДНК	2074,37	<i>omt</i>	OMT, O-метилтрансфераза	2363,16
32	<i>psacre</i>	защитный белок Avt9/cf-9 (ACRE)	2010,36	<i>mtl</i>	MTL, металлотионеин	2342,11
33	<i>had</i>	HAD-подобная гидролаза	1843,88	<i>asn</i>	ASN, аспарагинсинтаза	2305,26
34	<i>ms</i>	MS, метионин синтаза	1767,06	<i>acol</i>	ACO1, 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатоксидаза 1	2268,42
35	<i>rgp</i>	RGP, обратимо гликозилируемый полипептид	1690,23	<i>tctp</i>	ТСТР, трансляционно контролируемый опухолевый белок	2242,11
36	<i>psbc</i>	PSBC, белок реакционного центра CP43 фотосистемы II	1459,74	<i>pr-3</i>	PR-3, хитиназа GH19	2197,27
37	<i>clpp</i>	CLPP, АТФ-зависимая протеолитическая субъединица Clp протеазы	1382,91	<i>hsp90</i>	HSP90, белок теплового шока с молекулярной массой 90 кДа	2176,04
38	<i>hmg</i>	HMG, белок группы высокой мобильности	1382,91	<i>act</i>	АКТ, актин	2163,16
39	<i>nadp-mel</i>	NADP-ME1, НАДФ-зависимая малатдегидрогеназа	1382,91	<i>a-tub</i>	A-TUB, α-субъединица тубулина	2110,53
40	<i>aba/wds</i>	ABA/WDS, АБК-индукцибельный белок водного стресса	1229,26	<i>hsp40s</i>	HSP40S, кошаперон с молекулярной массой 40 кДа белка теплового шока HSP70	2096,42
41	<i>bi-1</i>	BI-1, BAX1-подобный проапоптотический белок	1229,26	<i>adf</i>	ADF, кофилин	2052,63
42	<i>aai-ltss</i>	AAI-LTSS, многофункциональный белок с выраженной ингибирующей активностью альфа-амилазы	1229,26	<i>14-3-3</i>	регуляторный белок 14-3-3	2036,84
43	<i>hsp40s</i>	HSP40S, кошаперон с молекулярной массой 40 кДа белка теплового шока HSP70	1159,82	<i>elf1</i>	ELF1, фактор элонгации транскрипции 1	1968,42
44	<i>drepp</i>	DREPP, плазмалемный регуляторный белок	1152,43	<i>aai-ltss</i>	AAI-LTSS, многофункциональный белок с выраженной ингибирующей активностью альфа-амилазы	1968,42
45	<i>elf1</i>	ELF1, фактор элонгации транскрипции 1	1075,59	<i>lrr-rlk</i>	LRR-RLK, лейцин-насыщенная рецептор-подобная протеинкиназа	1900,05

Как следует из таблицы 1, в контрольной группе проростков *P. sylvestris* из общего количества EST-локусов как превалировали, так и характеризовались наибольшим значением RPM, транскрипты генов, детерминирующие биологические процессы, ассоциированные с функционированием

фотосинтетического аппарата клетки (*cab2*, *psbC*, *psbA/D*, *psbH*, *psbK*), первичного метаболизма, регуляцией роста и развития растений (*ub*, *rubiscoss*, *ubc*, *cyp*, *tspa-tspf*, *mc*, *pk*, *mtl*, *omt*, *mtl*, *adf*), а также защитными реакциями на стрессовые воздействия абиотической (*aba/wds*) и биотической природы,

в том числе и патогенов (*pr-9 (pox)*, *psacre*, *amp1*, *aai-ltss*).

Для транскриптома проростков сосны обыкновенной, выращиваемых в условиях низкоположительных температур, был выявлен ряд отличий в уровне транскрипционной активности генов вовлеченных в процессы первичного метаболизма. Отмечено увеличение долевого участия в транскрипционном профиле генов *xth1* и *efla*. Полученные результаты согласуются с литературными данными, так, в работе Д. Такахаши с соавторами [24] показано, что под воздействием пониженных температур для транскриптома листьев *Arabidopsis thaliana* наблюдается повышение экспрессионной активности гена ксилоглюкана эндотрансгликозилазы (*xth*), который приводит к качественным изменениям в клеточной стенке и влияет на развитие холодоустойчивости растения. Аналогичные данные относительно увеличения экспрессии генов *xth* проростков красного перца (*Capsicum annuum* L.) при пониженной температуре (4 °C) отмечены и в другой работе [25]. Таким образом, повышенная экспрессия гена *xth* способствует укреплению клеточной стенки, секретирова ксилоглюканы, что потенциально является адаптацией к абиотическому стрессу пониженных температур.

Повышение уровня экспрессии α -субъединицы фактора элонгации 1 (*efla*) для исследуемого транскриптома проростков сосны обыкновенной в условиях пониженных температур находятся в соответствии с рядом исследований для различных растительных организмов. Так, при изучении холодовой акклиматизации травянистых растений Данном с соавторами было продемонстрировано участие фактора элонгации 1 в молекулярных механизмах адаптации к температурному стрессу [26]. В работе Фу с соавторами также отмечено увеличение транскрипционной активности генов, детерминирующих факторы элонгации EF, в условиях абиотического стресса и показано участие EF-белков в ответных реакциях растений на воздействие негативных факторов [27].

В условиях низкоположительных температур для проростков сосны обыкновенной нами было отмечено повышение уровня транскрипции генов *sams* и *samdc*, детерминирующих процессы биосинтеза этилена (гормональная регуляция) и высших полиаминов (антиокси-

дантная система) соответственно. Аналогичные результаты были получены при изучении трансформации транскриптомных профилей различных растений в условиях абиотического и биотического стресса, что подтверждает регуляторную и защитную функции *sams* и *samdc* в ходе формирования адаптационных реакций [28, 29].

Увеличение долевого участия транскриптов в профиле выявлено и для гена *aqp*, детерминирующего аквапорин — мембранный белок, входящий в систему регуляции водного обмена клетки. Согласно литературным данным, аквапорины принимают непосредственное участие в формировании защитных реакций растений по отношению к различным типам абиотического стресса, в том числе и условиям холодого шока [30].

В условиях холодого стресса отмечена повышенная экспрессия EST-локусов *aaa+*, *crt*, *bi-1*, что согласуется с литературными данными об их участии в защитном ответе растений на низкоположительные и отрицательные температуры. Так, белки семейства AAA+ нуклеозидтрифосфатгидролаза являются шапероноподобными АТФазами и в исследовании холодоустойчивости ели сибирской Т. Челлсена с соавторами показано участие данных белков в акклиматизации к пониженным температурам [31]. Кальретикулин является Ca^{2+} -связывающим высококонсервативным белком эндоплазматического ретикулюма и играет важную роль во множестве клеточных процессов, в том числе кальций-опосредованном сигналинге и подобно молекулярному шаперону участвует в сворачивании белков [32]. Согласно приведенным в литературе данным, CRT для растений является важным сигнальным компонентом для ответа на биотический и абиотический стресс, в том числе холодого, что подтверждает индуцированную холодом экспрессионную активность кальретикулина в нашей работе [33–35]. Для супрессора запрограммированной клеточной гибели (PCD) BAX1-подобного проапоптотического белка (BI-1) в литературе описана повышенная экспрессия при холодогом стрессе, при которой BI-1, предположительно, способствует синтезу теплоизоляционных сфинголипидов тканей растений, а также участвует в сдерживании PCD [36–38].

Также в случае холодового стресса наблюдается повышение активности генов, кодирующих белки, участвующие в формировании цитоскелета растительных клеток: актина (ACT), формирующего микрофиламенты; тубулинов (A-TUB, B-TUB) — структурных компонентов микротрубочек цитоскелета; актин-деполимеризующего фактора (ADF) — кофилина. Повышение экспрессионной активности структурных элементов цитоскелета клеток растений в условиях холодового шока отмечено и в литературных данных [39–41]. Предположительно, индуцирование генов *act*, *a/b-tub*, *adf* во время воздействия холодового стресса объясняется необходимостью перестройки цитоскелета во время акклиматизации.

Как следует из таблицы 1, различия в уровне транскрипционной активности также установлено между сравниваемыми группами проростков и по другим генам, кодирующим стресс-ассоциированные белки: дегидрин и шапероны семейств Hsp70 и Hsp90. Согласно литературным данным, дегидрины не только представляют собой один из молекулярных факторов, обеспечивающих поддержание водного баланса клетки, но и определяют функционирование сигнальной системы растения, участвуя в регулировании биосинтеза абсцизовой кислоты (АБК) [31]. Основной ролью белков-шаперонов является осуществление фолдинга и стабилизации третичной структуры белковых молекул, что имеет существенное значение в случаях повреждений или денатурации белков, вызванных воздействием различных стрессовых факторов [42, 43].

Проведенное сравнительное изучение степени транскрипционной активности генов, относящихся к системе конститутивной устойчивости растений к фитопатогенным микроорганизмам, показало, что в условиях холодового стресса происходит снижение долевого участия мРНК генов, детерминирующих белки с антимикробным действием: *pr-9*, *amp1*, *psacre*, *lrr-rlk*, а для защитных *ss/af* и *pr-3* EST-локусов отмечается увеличение экспрессионной активности. Для белков PR-3 (хитиназ IV класса) проростков сосны обыкновенной ранее описывались антифризные свойства и повышенная экспрессионная активность под воздействием холодового стресса [21].

Кроме EST-локусов, представленных в таблице 1, в исследуемых транскриптомах проростков сосны обыкновенной был идентифицирован дополнительный набор локусов, ассоциированных, согласно генной онтологии, с защитными механизмами растений по отношению к фитопатогенным микроорганизмам: *pr-12*, *pr-10*, *cam*, *gst* и *grp*. Результаты сравнительной оценки уровня транскрипционной активности по данным генам между исследованными группами семян представлены в таблице 2.

Как следует из таблиц 1 и 2, экспрессионная активность большинства защитных генов в транскриптоме проростков сосны обыкновенной, подверженных низкочастотным температурам, была значительно снижена по сравнению с контрольной группой. В то же время для гена, кодирующего PR-10-белок, наблюдалась сходная экспрес-

Таблица 2

Значения уровня экспрессии EST-локусов, ассоциированных с защитными свойствами к фитопатогенным микроорганизмам исследуемых транскриптомов относительно одного миллиона прочтений (RPM)

EST-локус	Детерминируемый белок	RPM	
		Холодовой стресс	Контрольная группа
<i>pr-12</i>	PR-12, дефензин	–	1767,37
<i>pr-10</i>	PR-10	927,86	1098,63
<i>cam</i>	CAM, кальмодулин	921,94	1369,31
<i>gst</i>	GST, глутатион-S-трансфераза подсемейства класса Тау	154,64	1040,25
<i>grp</i>	GRP, глицин-насыщенные РНК-связывающие белки	154,64	520,13

сионная активность. В литературе описан индуцибельный характер экспрессии генов *pr-10* под воздействием негативных как биотических, так и абиотических факторов, в том числе и холода. Однако в исследовании Дж. Лю с соавторами было продемонстрировано незначительное повышение уровня экспрессии гена *pr-10* семян *Pinus monticola*, подверженных низкоположительным температурам (5 °С). Таким образом, полученные нами результаты согласуются с проведенными ранее исследованиями [44].

Исходя из полученных данных, одна из особенностей сравниваемых транскриптомных профилей — разнонаправленный характер изменений активности для генов, представляющих один и тот же метаболический цикл или физиологический процесс, в том числе используемых в литературе как гены нормализаторы для видов рода *Pinus*: актин, α -тубулин, α -субъединица фактора элонгации 1, убиквитин [45, 46]. Таким образом, для выражения нормализации экспрессии генов при проведении количественной ПЦР проростков сосны обыкновенной, выращенных в различающихся условиях, необходимо использовать среднее геометрическое значение экспрессий комбинаций генов-нормализаторов.

Заключение

Согласно полученным результатам, установлено, что под воздействием холодового стресса происходят существенные изменения экспрессионной активности различных генов, в том числе ассоциированных с устойчивостью растений к фитопатогенным микроорганизмам. Полученные данные подтверждают то, что холодовый стресс является одним из факторов ослабления растительных организмов и может способствовать развитию болезней всходов сосны обыкновенной инфекционной природы.

Гены *xth1*, *efla*, *sams*, *samdc*, *aqp*, *aaa+*, *crt*, *bi-1*, *act*, *a/b-tub*, *adf*, *ss/af* и *pr-3*, характеризующиеся повышенной экспрессией индуцированной холодовым стрессом, могут быть использованы как маркеры физиологического состояния, так и для диагностики холодоустойчивых генотипов проростков сосны обыкновенной.

Список использованных источников

1. Воробьева, М. В. Лесная фитопатология. Лесная фитопатология : метод. указания / М. В. Воробьева. – Урал. гос. лесотехн. ун-т. – Екатеринбург : УГЛТУ, 2015. – С. 11.
2. Федоров, Н. И. Лесная фитопатология: Учеб. для студентов специальности «Лесное хозяйство» / Н. И. Федоров – Мн.: БГТУ, 2004. – С. 197.
3. Семенкова, И. Г., Соколова, Э. С. Фитопатология: учеб. для студ. вузов / И. Г. Семенкова, Э. С. Соколова – М.: Изд. центр «Академия», 2003. – С. 203.
4. Chinnusamy, V. Cold stress regulation of gene expression in plants / V. Chinnusamy, J. Zhu, J. K. Zhu // Trends in plant science. – 2007. – Vol. 12, № 10. – P. 444–451.
5. Steponkus, P. L. A contrast of the cryostability of the plasma membrane of winter rye and spring oat-two species that widely differ in their freezing tolerance and plasma membrane lipid composition / P. L. Steponkus // Advances in low temperature biology. – 1993. – Vol. 3. – P. 211–312.
6. Strauss, G., Hauser H. Stabilization of lipid bilayer vesicles by sucrose during freezing / G. Strauss, H. Hauser // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1986. – Vol. 83, № 8. – P. 2422–2426.
7. Anchordoguy, T. J. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. Cryobiology / T. J. Anchordoguy [et. al.]. – 1987. – Vol. 24, № 4. – P. 324–331.
8. Aroca, R. Drought enhances maize chilling tolerance. II. Photosynthetic traits and protective mechanisms against oxidative stress / R. Aroca, J. J. Irigoyen, M. Sánchez-Díaz // Physiologia Plantarum. – 2003. – Vol. 117, № 4. – P. 540–549.
9. Fowler, S. Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway / S. Fowler, M. F. Thomashow // The Plant Cell. – 2002. – Vol. 14, № 8. – P. 1675–1690.
10. Kreps, J. A. Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress / Kreps [et al.] // Plant physiology. – 2002. – Vol. 130, № 4. – P. 2129–2141.
11. Seki, M. Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought,

- cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray / Seki [et al.] // *The Plant Journal*. – 2002. – Vol. 31, № 3. – P. 279–292.
12. Park, S. Regulation of the Arabidopsis CBF regulon by a complex low-temperature regulatory network / S. Park [et al.] // *The Plant Journal*. – 2015. – Vol. 82, № 2. – P. 193–207.
13. Lee, B. The Arabidopsis cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1 // *The Plant Cell*. – 2005. – Vol. 17, № 11. – P. 3155–3175.
14. Seki, M. Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection / M. Seki [et al.] // *Current opinion in biotechnology*. – 2003. – Vol. 14, № 2. – P. 194–199.
15. Hong-Bo, S. LEA proteins in higher plants: structure, function, gene expression and regulation / S. Hong-Bo, L. Zong-Suo, S. Ming-An // *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*. – 2005. – Vol. 45, № 3-4. – P. 131–135.
16. Guy, C. L. The organization and evolution of the spinach stress 70 molecular chaperone gene family / C. L. Guy, Q. B. Li // *The Plant Cell*. – 1998. – Vol. 10, № 4. – P. 539–556.
17. Kosová, K. The role of dehydrins in plant response to cold / K. Kosová, P. Vítámvás, I. T. Prášil // *Biologia plantarum*. – 2007. – Vol. 51, № 4. – P. 601–617.
18. Falavigna, V. D. S. Functional diversification of the dehydrin gene family in apple and its contribution to cold acclimation during dormancy / V. D. S. Falavigna [et al.] // *Physiologia plantarum*. – 2015. – Vol. 155, № 3. – P. 315–329.
19. Gusta, L. V. Plant cold hardiness: from the laboratory to the field / L. V. Gusta, M. Wisniewski, K. K. Tanino // CABI, Oxfordshire, UK. – 2009. – 317 p.
20. Strimbeck, G. R. Cold in the common garden: comparative low-temperature tolerance of boreal and temperate conifer foliage / G. R. Strimbeck [et al.] // *Trees Struct Funct*. – 2005. – Vol. 21. – P. 557–567.
21. Joosen, R. V. L. Correlating gene expression to physiological parameters and environmental conditions during cold acclimation of *Pinus sylvestris*, identification of molecular markers using cDNA microarrays Correlating / R. V. L. Joosen [et al.] // *Tree Physiology*. – 2006. – Vol. 26, № 10. – P. 1297–1313.
22. Можаровская, Л. В. Функциональная аннотация генов *Pinus sylvestris*, ассоциированных с устойчивостью к фитопатогенным микромицетам / Л. В. Можаровская // *Журнал Белорусского государственного университета. – Биология*. – 2018. – № 2. – С. 78–84.
23. Aanes, H. Normalization of RNA-sequencing data from samples with varying mRNA levels / H. Aanes [et al.] // *PloS one*. – 2014. – Vol. 9, № 2. – P. e89158
24. Takahashi, D. Both cold and sub-zero acclimation induce cell wall modification and changes in the extracellular proteome in *Arabidopsis thaliana* / D. Takahashi // *Scientific reports*. – 2019. – Vol. 9, № 1. – P. 1–15
25. Cho, S. K. Constitutive expression of abiotic stress-inducible hot pepper CaXTH3, which encodes a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase homolog, improves drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants / S. K. Cho [et al.] // *FEBS letters*. – 2006. – Vol. 580, № 13. – P. 3136–3144.
26. Dunn, M. A. A low-temperature-responsive translation elongation factor 1 α from barley (*Hordeum vulgare* L.) / M. A. Dunn [et al.] // *Plant molecular biology*. – Vol. 23, № 1. – 1993. – P. 221–225.
27. Fu, J. Roles of protein synthesis elongation factor EF-Tu in heat tolerance in plants / J. Fu, I. Momcilovic, P. V. Prasad // *Journal of Botany*. – Vol. 2012. – 2012. – P. 1–8.
28. Kazan, K. Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance / K. Kazan // *Trends in plant science*. – Vol. 20, № 4. – 2015. – P. 219–229.
29. Hu, W. W. The pivotal roles of the plant S-adenosylmethionine decarboxylase 5' untranslated leader sequence in regulation of gene expression at the transcriptional and posttranscriptional levels / W. W. Hu, H. Gong, E. C. Pua // *Plant physiology*. – Vol. 138, № 1. – 2005. – P. 276–286.
30. Wang, M. The Interactions of Aquaporins and Mineral Nutrients in Higher Plants / M. Wang [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – Vol. 17, № 8. – 2016. – P. 1229.
31. Kjellsen, T. D. Proteomics of extreme freezing tolerance in Siberian spruce (*Picea obovata*) / T. D. Kjellsen [et al.] // *Journal of proteomics*. – 2010. – Vol. 73, № 5. – P. 965–975.

32. Jia, X. Y. Calreticulin: conserved protein and diverse functions in plants / X. Y. Jia [et al.] // *Physiologia Plantarum*. – 2009. – Vol. 136, № 2. – P. 127–138.
33. Joshi, R., Paul, M., Kumar, A., & Pandey, D. (2019). Role of calreticulin in biotic and abiotic stress signalling and tolerance mechanisms in plants. *Gene*, 714, 144004.
34. Komatsu, S. Over-expression of calcium-dependent protein kinase 13 and calreticulin interacting protein 1 confers cold tolerance on rice plants / S. Komatsu [et al.] // *Molecular Genetics and Genomics*. – 2007. – Vol., 277, № 6. – P. 713–723.
35. Qiu, Y., Xi, J., Du, L., & Poovaiah, B. W. (2012). The function of calreticulin in plant immunity: new discoveries for an old protein / Y. Qiu, J. Xi, L. Du, B. W. Poovaiah // *Plant signaling & behavior*. – 2012. – Vol. 7, № 8. – P. 907–910.
36. Nagano, M. Arabidopsis Bax inhibitor-1 promotes sphingolipid synthesis during cold stress by interacting with ceramide-modifying enzymes / M. Nagano [et al.] // *Planta*. – 2014. – Vol. 240, № 1. – P. 77–89.
37. Ihara-Ohori, Y. (2007). Cell death suppressor Arabidopsis bax inhibitor-1 is associated with calmodulin binding and ion homeostasis / Y. Ihara-Ohori [et al.] // *Plant physiology*. – 2007. – Vol. 143, № 2. – P. 650–660.
38. Chen, X. H. Cucumber BAX inhibitor-1, a conserved cell death suppressor and a negative programmed cell death regulator under cold stress / X. H. Chen [et al.] // *Biologia plantarum*. – Vol. 57, № 4. – P. 684–690.
39. Ouellet, F. Regulation of a wheat actin-depolymerizing factor during cold acclimation / F. Ouellet [et al.] // *Plant Physiology*. – 2001. – Vol. 125, № 1. – P. 360–368.
40. Örvar, B. L. Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity / B. L. Örvar [et al.]. – 2000. – *The Plant Journal*. – Vol. 23, № 6. – P. 785–794.
41. Ridha Farajalla, M. The α -tubulin gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.) and differential gene expression during cold acclimation / M. Ridha Farajalla, P. Gulick // *Genome*. – 2007. – Vol. 50, 5. – P. 502–510.
42. Renaut, J. Biochemical and physiological mechanisms related to cold acclimation and enhanced freezing tolerance in poplar plantlets / J. Renaut, L. Hoffmann, J. F. Hausman // *Physiologia Plantarum*. – Vol. 125, 1. – 2005. – P. 82–94.
43. Breiman, A. Plant Hsp90 and its co-chaperones / A. Breiman // *Current Protein and Peptide Science*. – Vol. 15, № 3. – 2014. – P. 232–244.
44. Liu, J. J. Differential expression of multiple PR10 proteins in western white pine following wounding, fungal infection and cold-hardening / J. J. Liu, A. K. Ekramoddoullah, X. Yu // *Physiologia Plantarum*. – 2003. – Vol. 119, № 4. – P. 544–553.
45. Zhu, P. Selection of suitable reference genes in *Pinus massoniana* Lamb. under different abiotic stresses for qPCR normalization / P. Zhu [et al.] // *Forests*. – 2019. – Vol. 10, № 8. – P. 632.
46. De Vega-Bartol, J. J. Normalizing gene expression by quantitative PCR during somatic embryogenesis in two representative conifer species: *Pinus pinaster* and *Picea abies* / J. J. de Vega-Bartol // *Plant cell reports*. – 2013. – Vol. 32, № 5. – P. 715–729.

L. V. Mozharovskaya

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE EXPRESSION ACTIVITY OF SCOTS PINE SEEDLING GENES IN COLD STRESS CONDITIONS

State Scientific Institution
“Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus”
71 Proletarskaya St., 246050 Gomel, Republic of Belarus
e-mail: milamozh@yandex.by

Based on the data of next generation sequencing of transcriptomes of Scots pine seedlings, the genes characterized by induced expression activity under cold stress conditions were identified: *xth1*, *efla*, *sams*, *samdc*, *aqp*, *aaa+*, *crt*, *bi-1*, *act*, *a/b-tub*, *adf*, *ss/af* and *pr-3*. The data obtained can be used to form a set of candidate genes for diagnosing both the physiological state and cold-tolerant genotypes of Scots pine at the seedling stage.

Keywords: Scots pine, next-generation sequencing, transcriptome, cold stress, resistance genes.

Дата поступления статьи: 22 февраля 2021 г.

I. S. Kazlouski¹, I. V. Belskaya², A. B. Bulatovskiy¹, A. I. Zinchenko¹

THE USE OF A CELL-FREE PROTEIN SYNTHESIS FOR OBTAINING BACTERIAL DIGUANYLATECYCLASE AND TWO CHIMERIC PROTEINS

¹State Scientific Institution

“Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus”

2 Kuprevich St., 220141 Minsk, Republic of Belarus

e-mail: kazlouski.illia@gmail.com

²The Republican Research and Practical Center for
Epidemiology and Microbiology

23 Filimonova St., 220114 Minsk, Republic of Belarus

The novel promising trend of biotechnology is cell-free synthesis of proteins. Possibility of producing two chimeric proteins: adenosine deaminase of *Escherichia coli* fused with human annexin-A5, DNA-affine domain of bacteria *Sulfolobus solfataricus* fused with modified Taq-DNA-polymerase and bacterial enzyme diguanylatecyclase of *Thermotoga maritima*, by cell-free synthesis procedure as an alternative to conventional cultivation of microbial strains-producers in a bioreactor was studied in this research. Chimeric RNA polymerase of T7 bacteriophage, S30-cell extract of *E. coli* and multicopy plasmid pET42mut were engaged for protein synthesis by cell-free protein synthesis system. The first successful production of these proteins was demonstrated in CFPS system.

Keywords: chimeric protein, diguanylatecyclase, annexin-A5, adenosine deaminase, SSo-Taq-polymerase, *Escherichia coli*, cell-free protein synthesis system, multicopy plasmid.

Introduction

Currently, biotechnology based on genetic engineering is widely used to obtain drugs of peptide or protein nature [1]. Despite notable success, this approach has significant limitations:

1) not all genes are expressed in a “foreign environment”;

2) the expression of polycistronic genes has not been demonstrated so far;

3) post-translational modification and formation of the structure of multidimensional proteins of eukaryotes can not be realized in bacterial cells.

A number of research groups use cell-free systems as an alternative to the conventional whole-cell technology to produce valuable proteins, especially membranes, therapeutic proteins and polypeptides containing unnatural amino acids [2].

The system of cell-free protein synthesis (CFPS) provides for gene transcription and translation of mRNA *in vitro* in a cell lysate. The lysate contains recombinant DNA, amino acids,

nucleotides, cofactors, and ATP-regenerating system. However, endogenous genetic information (DNA and mRNA) is removed.

Compared to the whole cells systems, CFPS systems offer several options. Noteworthy is production of exceptionally target protein, the opportunity to synthesize proteins toxic for cells; the possibility to synthesize proteins that contain unnatural amino acids, and as the main advantage, it becomes possible to resolve the problem of aggregation by adding into reaction mixture the agents maintaining the synthesized polypeptide in soluble form.

The main goal of this study was production of several recombinant proteins in the CFPS system. Their synthesis was problematic by the traditional methods relying on whole bacterial cells. In particular, it was planned to synthesize *Thermotoga maritima* diguanylatecyclase (DGC). The enzyme condenses GTP into a promising new generation adjuvant as cyclic diguanyl monophosphate [3]. In addition, we were interested in two chimeric proteins: the

pharmacologically valuable human annexin-A5 fused with *Escherichia coli* adenosine deaminase (Annexin-ADase) [4], and DNA polymerase with improved properties due to attachment to Taq-DNA polymerase DNA-binding domain (SSo7D) of the bacterium *Sulfolobus solfataricus* (Sso-Taq polymerase) [5].

Materials and Methods

DNA from *T. maritima*, low-copy plasmids pET42-A5-add [4] and pET18b-STaq [5] served as sources of genes encoding DGC (*TM1788*), Annexin-Adase (*anxA5-add*), and Sso-Taq-polymerase (*SSO_RS12375-taq*) respectively. The target DNA fragments were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using synthetic primers. The selection of primers was carried out using the UGENE 1.22 software (UniPro, Russia) based on the nucleotide sequences of the target genes. Sequences complementary to plasmid pET42mut were added to the 5'-ends of the primers [6]. Amplification was carried out according to the following program: pre-denaturation stage (30 s at 98 °C) — 30 amplification cycles (10 s at 98 °C; 15 s at 55 °C; 1 min at 72 °C) — final elongation 75 s at 72 °C. At the second stage, the pET42mut plasmid was linearized by the method described earlier [6].

During the next stage, the linearized vector and target genes were recovered by overlap extension PCR (OV-PCR) [7] according to the following protocol: Initial denaturation stage (30 s at 98 °C) — 16 amplification cycles (10 s at 98 °C; 15 s at 50 °C; 4 min at 72 °C) — Final extension for 5 min at 72 °C. At this stage, the fragments resulting from the first two stages were used in equimolar amounts as a template and a primer.

The product synthesized from OV-PCR was applied to transform competent cells of *E. coli* XL1 Blue (Novagen, USA) by electroporation technique, followed by inoculation on a solid nutrient medium with kanamycin (100 µg / ml). The cells with integrated plasmids were cultured in the liquid LB medium until subsequent extraction of plasmid DNA by alkaline hydrolysis.

The protein synthesis was performed in 1.0 ml of the reaction mixture containing 0.25 ml of the S30 cell extract *E. coli*, 0.65 ml of the

premix, 5000 units Sso7d-RNA polymerase of bacteriophage T7 [8], 500 ng of plasmid DNA obtained at the previous stage. The reaction mixture was incubated at 30 °C for 5–6 h. The activity of the target enzymes was determined according to the methods described in [3], [4] and [5].

Results and Discussion

The first research stage was focused on the amplification of the *TM1788*, *anxA5-add*, and *SSO_RS12375-taq* genes encoding the amino acid sequences of DGC, Annexin-ADase, and Sso-Taq polymerase, respectively.

Horizontal DNA electrophoresis in agarose gel after isolation and amplification of genes proved that nucleotide sequences of the required sizes were obtained: *TM1788* — 750 bp, *anxA5-add* — 2000 bp. and *SSO_RS12375-taq* — 2800 bp. (fig. 1).

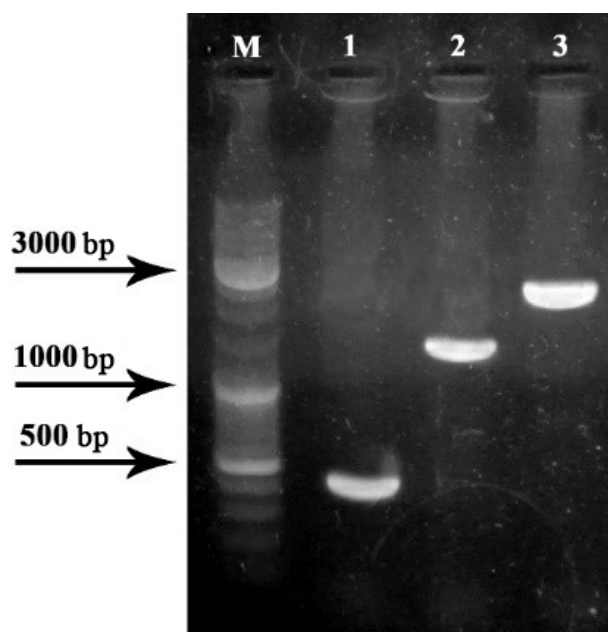


Fig. 1. Electropherogram of amplification products of genes *TM1788* (1), *anxA5-add* (2) and *SSO_RS12375-taq* (3); M — molecular weight marker of DNA fragments

At the next stage, the pET42mut vector was linearized using PCR, and then OV-PCR was performed. In contrast to standard PCR, it requires the presence of overlapping complementary regions in the vector and insertions added at the stage of cloning the target genes. Thus,

the genes of interest *TMI788*, *anxA5-add* and *SSO_RS12375-taq* were inserted into the plasmid pET42mut.

Competent *E. coli* XL1 Blue cells were transformed with polynucleotide material originating OV-PCR. Plasmids were isolated from the grown transformation cells, which were further subjected to sequencing to confirm the lack of unwanted spontaneous mutations.

At the next stage, the efficiency of DGC, Annexin-ADase, and SSo-Taq-polymerase synthesis in the CFPS system was evaluated. The final concentration of the reaction components was 100 mM HEPES-KOH (pH 8.0), 8 mM magnesium acetate, 90 mM potassium acetate, 20 mM potassium phosphoenolpyruvate, a set of amino acids (each at 1.3 mM concentration), 0.15 mg / ml of folic acid, each of four ribonucleoside-5'-triphosphates at 1 mM concentration, 0.05% sodium azide, 2% polyethylene glycol-8000, 0.04 mg / ml pyruvate kinase, 5.5 µg / ml Sso7d-RNA polymerase phage T7, 0.3 mg / ml plasmid DNA-containing genes encoding the target proteins, 0.5 mg / ml total tRNA and S30 extract obtained from *E. coli* cell lysate (30% of the total vol-

ume of the reaction mixture). The incubation lasted for 6 h at 30 °C with moderate stirring. 1 µl sample was taken every hour for analysis of the enzymatic activity of the synthesized proteins in order to control the synthesis of enzymes. A reaction mixture containing appropriate amount of buffer solution was used as a negative control instead of plasmid DNA. The results of the synthesis of Sso-Taq-polymerase, Annexin-ADase, and DGC are shown in figure 2.

The final concentrations of DGC, Annexin-ADase, and Sso-Taq polymerase were 45 U / ml, 5 U / ml, and 250 U / ml respectively in the resulting enzyme preparations. The highest concentrations of these proteins were 0.0036 U / ml [3], 0.1325 U / ml [4] and 240 U / ml [5], respectively, in the cultural liquids, following their production in whole-cell expression systems. It can be seen that the expression level of SSo-Taq polymerase is close to the whole cell level, which may indicate that the conditions for the synthesis of this enzyme in the CFPS system were not fully optimized and it is essential to continue the studies of this process.

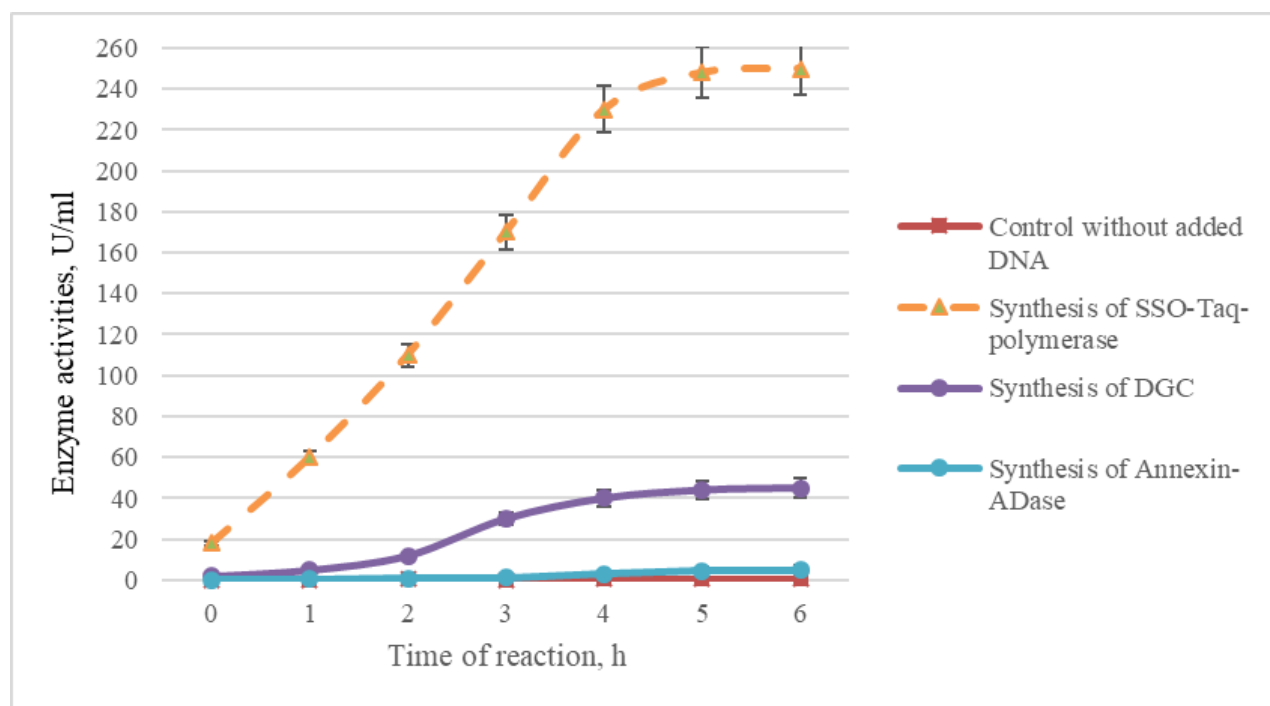


Fig. 2. Dynamics of the accumulation of recombinant proteins in the reaction mixture during synthesis in the CFPS system

Conclusion

The first successful production of bacterial enzyme DGC *T. maritima* and two chimeric proteins (Annexin-ADase and Sso-Taq polymerase) was demonstrated in CFPS system.

For the first time, the CFPS system was used to obtain the bacterial enzyme DGC *T. maritima*, and two chimeric proteins (Annexin-ADase and Sso-Taq polymerase).

After partial optimization of the reaction conditions, 1 ml samples of DGC, Annexin-ADase and Sso-Taq-polymerase enzyme preparations with activities 45 U / ml, 5 U / ml and 250 U / ml, respectively, were obtained. In our opinion, the synthesis of these proteins in the CFPS system can be an alternative to submerged cultivation of microbial strains-producers in a bioreactor.

References

1. Sambyal, K. Bioprocess and genetic engineering aspects of ascomycin production: a review / K. Sambyal, R. V. Singh // *J. Genet. Eng. Biotechnol.* – 2020. – Vol. 18. – P. 73.
2. Cell-free protein synthesis: a promising option for future drug development / S. K. Dondapati [et al.] // *BioDrugs.* – 2020. – Vol. 34. – P. 327–348.
3. Enzymatic synthesis of c-di-GMP using inclusion bodies of *Thermotoga maritima* full-length diguanylate cyclase / A. S. Korovashkina [et al.] // *J. Biotechnol.* – 2012. – Vol. 164. – P. 2276–2280.
4. Construction of strain-producer of chimeric protein containing human annexin and bacterial adenosine deaminase / A. B. Bulatovski [et al.] // *Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus.* – 2017. – Vol. 61, № 4. – P. 89–95.
5. Production of thermostable DNA polymerase suitable for whole-blood polymerase chain reaction / A. S. Korovashkina [et al.] // *Biochemistry and Biotechnology: Research and Development* / Eds: S. D. Varfolomeev, G. E. Zaikov, L. P. Krylova. New York, Nova Science Publishers, Inc. – 2012. – P. 1–5.
6. Kazlouski, I. S. Modifikaciya ekspressionnoj pET-sistemy dlya ispolzovaniya v beskletochnom sinteze belka / I. S. Kazlouski, A. N. Rymko, A. I. Zinchenko // *Sb. nauch. trudov Instituta mikrobiologii NAN Belarusi «Mikrobnie biotekhnologii: fundamentalnie i prikladnie aspekti».* – 2018. – Vol. 10. – P. 69–78.
7. Quan, J. Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways / J. Quan, J. Tian // *PloS ONE.* – 2009. – Vol. 4, № 7. – P. 6441–6442.
8. Kazlouski, I. S. Sozdanie shtamma-producenta himernogo belka, sostoyashchego iz RNK-polimerazi i DNK-affinnogo domena / I. S. Kazlouski, A. I. Zinchenko // *Dokl. Nac. akad. nauk Belarusi.* – 2018. – Vol. 62, № 5. – P. 601–607.

И. С. Казловский¹, И. В. Бельская², А. Б. Булатовский¹, А. И. Зинченко¹

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИСТЕМЫ БЕСКЛЕТОЧНОГО СИНТЕЗА БЕЛКА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ДИГУАНИЛАТЦИКЛАЗЫ И ДВУХ ХИМЕРНЫХ БЕЛКОВ

¹Государственное научное учреждение
«Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь, 220141, г. Минск, ул. Купревича, 2
e-mail: kazlouski.illia@gmail.com

²Республиканский научно-практический центр
эпидемиологии и микробиологии
Республика Беларусь, 220114, г. Минск, ул. Филимонова, 23

Новым перспективным направлением в биотехнологии является бесклеточный синтез белка (БСБ). В представленном исследовании изучена возможность синтеза в бактериальной системе БСБ дигуанилатциклазы (ДГЦ) бактерии *Thermotoga maritima* и двух химерных белков: человеческого аннексина-А5, слитого с аденозиндезаминазой *Escherichia coli* (аннексин-АДаза), и модифицированной *Taq*-ДНК-полимеразы, слитой с ДНК-аффинным доменом бактерии *Sulfolobus solfataricus* (SSo-*Taq*-полимераза). В реакционной смеси для бесклеточного синтеза этих белков использовали химерную РНК-полимеразу бактериофага T7, клеточный экстракт *E. coli*, и высококопийную плазмиду pET42mut. В результате исследования впервые показана возможность синтеза вышеупомянутых белков в системе БСБ.

Ключевые слова: химерный белок, дигуанилатциклаза, аннексин-А5, аденозиндезаминаза, SSo-*Taq*-полимераза, *Escherichia coli*, бесклеточный синтез белка, высококопийная плаزمид.

Дата поступления статьи: 31 марта 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ ПО ОФОРМЛЕНИЮ СТАТЕЙ

Редакция сборника научных трудов «Молекулярная и прикладная генетика» принимает к рассмотрению обзорные статьи и экспериментальные статьи по результатам исследований, выполненных с использованием современных методов в области молекулярной и прикладной генетики, отражающие изучение фундаментальных генетических процессов на молекулярном, клеточном, организменном и популяционном уровнях. Особое внимание уделяется актуальным проблемам биоинформатики и системной биологии, биоинженерии, вопросам сохранения и рационального использования генетических ресурсов, а также исследованиям, основанным на междисциплинарном подходе.

Статьи публикуются на русском, белорусском и английском языках.

Сборник входит в Перечень научных изданий, рекомендованных ВАК для опубликования результатов диссертационных работ (для биологических, медицинских (медико-биологические аспекты), сельскохозяйственных наук), и реферируется и индексируется в РИНЦ (Российский индекс научного цитирования).

Решение о публикации принимается редакционной коллегией после рецензирования, учитывая научную значимость и актуальность представленных материалов.

ДЛЯ ОПУБЛИКОВАНИЯ РАССМАТРИВАЮТСЯ СЛЕДУЮЩИЕ ТИПЫ СТАТЕЙ

Экспериментальная статья

Основной тип статей, размещаемых в сборнике. Этот формат предназначен для публикации полученных авторами новых данных, представляющих существенный интерес для научного сообщества. Объем экспериментальной статьи не должен превышать 12 страниц. В список использованных источников следует включать не более 30 источников.

Обзорная статья

Авторы могут предложить для публикации обзорную статью по теме, представляющей интерес для широкого круга читателей. Объем обзорной статьи не должен превышать 15 страниц. В список использованных источников следует включать не более 50 источников.

Краткое сообщение

В исключительных случаях по решению редколлегии в сборнике публикуются краткие сообщения объемом не более 5 страниц, список литературы в этом случае не должен включать более 15 источников.

СТРУКТУРА СТАТЬИ

Статья набирается в текстовом редакторе Microsoft Word. Поля: верхнее и нижнее — 2 см, левое — 3 см, правое — 1,5 см. Текст набирается шрифтом Times New Roman, 12 пт, в одну колонку с одинарным межстрочным интервалом. Выравнивание — по ширине. Абзацный отступ — 1,25 см. Не допускается использование табуляции или пробелов для обозначения первой строки абзаца. Автоматическая расстановка переносов обязательна. Все страницы должны быть пронумерованы. Для создания формул следует использовать только **MathType**.

1. УДК

Располагается в верхнем левом углу страницы.

2. Инициалы и фамилии авторов

Располагаются по центру, выделяются полужирным начертанием. Между инициалами и перед фамилией ставятся неразрывные пробелы (Ctrl + Shift + пробел) (**И. И. Иванов**).

3. Название статьи

Располагается по центру, набирается **ПРОПИСНЫМИ БУКВАМИ** полужирным начертанием. Переносы в заголовках не допускаются.

Название статьи должно четко отражать суть работы, не содержать лишних слов. По возможности следует избегать узкой региональности, а данные о географии исследования давать в резюме.

4. Место работы авторов с почтовым адресом

Место работы авторов (аббревиатура не допускается) располагается по центру, набирается прямым начертанием. На следующей строке указывается почтовый адрес учреждения (страна, индекс, город, улица, дом).

Если авторы работают в разных учреждениях, то после каждой фамилии и перед соответствующим местом работы надстрочными знаками проставляется цифровой индекс (1, 2 и т. д.).

5. Авторское резюме (аннотация)

Располагается после места работы авторов, набирается прямым начертанием.

Авторское резюме должно полно и понятно излагать основное содержание и результаты проведенного исследования. Если из названия статьи очевидны предмет, тема, цель, методы исследования, их не следует повторно излагать в резюме. Объем текста аннотации определяется содержанием публикации (объемом сведений, их научной ценностью и/или практическим значением) и должен быть в пределах 800–1000 знаков с пробелами.

6. Ключевые слова (5–10 слов)

Перечисляются после слов «Ключевые слова:». В конце ставится точка.

7. Основной текст статьи

Экспериментальная статья должна включать следующие разделы: «**Введение**», «**Материалы и методы**», «**Результаты и обсуждение**», «**Заключение**», «**Список использованных источников**». Обзорная статья и краткое сообщение в обязательном порядке должны содержать разделы: «**Введение**», «**Заключение**» и «**Список использованных источников**». Название остальных разделов выбирается на усмотрение авторов.

Названия разделов располагаются на отдельной строке по центру и выделяются полужирным начертанием.

Изложение статьи должно быть ясным, сжатым, без длинных исторических введений и повторений.

Помимо общепринятых сокращений единиц измерения, физических, химических и математических величин и терминов (например, ДНК), допускаются аббревиатуры словосочетаний, часто повторяющихся в тексте. Все вводимые автором буквенные обозначения и аббревиатуры должны быть расшифрованы в тексте при их первом упоминании.

Вставка в текст символов (например, β , ϵ) производится только через опцию Вставка/Символ.

Для набора надстрочных и подстрочных символов (C^2 , C_4) использовать меню *Шрифт/Надстрочный знак/Подстрочный знак*.

Общие правила набора текста

Прямое начертание должны иметь:

- 1) греческие символы (α , β , δ , φ , λ и др.) и знаки ($\%$, \leq , \pm , \times , \neq , ∞ , \rightarrow , $^\circ$, \notin и др.);
- 2) единицы измерения (Вт, В, Дж, кг, м и пр.);
- 3) кириллические (т. е. русские) буквы (П, Л, Ц);
- 4) сокращения от русских или белорусских слов ($q_{св}$);
- 5) обозначения химических элементов и соединений (Р, H_2O);
- 6) названия белков;
- 7) скобки () и запятые (,) в формулах и после них ($x^2 - 0,5b(1,5 + ca)$).

Курсивное начертание должны иметь названия генов, латинские (т. е. английские) буквы, обозначающие переменные (K , y , z , x , V , i , j), латинские названия семейств, родовые и видовые названия.

Без пробелов следует проставлять:

- 1) дефис (-) в сложных словах (минерал-индикатор, К-пространство) и при наращении падежных окончаний к цифрам и буквам (1-го, j-го);
- 2) короткое тире (—) (Ctrl + «←» на нумерационной клавиатуре) между цифрами, обозначающими пределы какой-либо величины (20–30 чел.);
- 3) знаки -, +, ≤, > в значении положительной или отрицательной величины, степени увеличения или уменьшения;
- 4) знак %;
- 5) скобки () и кавычки «» от заключенных в них слов (по всей работе кавычки должны быть одного рисунка — «елочки»).

С пробелами проставлять:

- 1) тире (—) (Ctrl + Alt + «←» на нумерационной клавиатуре) с обеих сторон пробелом как знак препинания между словами.
- 2) математические знаки (–, +, ≤, ±, ·, ×, =, ≠ и др.) в формулах, уравнениях, когда они являются знаками арифметического действия ($R_1 + R_2 = 0,75$);
- 3) знаки №, § от следующих за ними чисел (№ 4);
- 4) многозначные целые числа, содержащие 5 и более знаков, разбиваются по 3 цифры справа налево (40 450, 8 345 458);
- 5) сокращенные слова от имен собственных, к которым они относятся (ул. Академическая);
- 6) цифры от полных или сокращенных наименований (100 м, 2005 г.).

Требования к рисункам

Растровые изображения должны иметь разрешение не менее 300 dpi для полутоновых изображений (фотографии, газетные вырезки, книжные иллюстрации) и не менее 600 dpi для штриховых изображений (графики, таблицы, детали, выполненные чертежными инструментами). Повышение разрешения после сканирования программными средствами недопустимо.

Рисунки должны размещаться только после их упоминания в тексте статьи. Если ссылка на рисунок включена в предложение, используется полное написание — «рисунок 1»; если слова заключаются в скобки, используется сокращение — (рис. 1).

Слово **Рис. 1.** и подрисовочная подпись располагаются на следующей строке после самого рисунка (**Рис. 1.** Название). Точка после названия не ставится.

Рисунки должны быть представлены в электронном виде отдельными файлами в следующих форматах: JPEG, TIFF, PNG. Название файла должно соответствовать номеру рисунка (Рис. 1, Рис. 2 и т. д.). Для отправки все файлы рисунков объединяются в одну архивную папку zip или rar. Не допускается размещение рисунков в конце статьи (перед списком литературы).

Оформление таблиц

Таблицы должны быть реализованы средствами работы с таблицами редактора Microsoft Word. Не допускается вложение таблиц, созданных в других программах.

Таблицы должны быть пронумерованы и иметь названия, размещаться только после их упоминания в тексте статьи. Если ссылка на таблицу включена в предложение, используется полное написание — «таблица 1»; если слова заключаются в скобки, используется сокращение — (табл. 1).

Слово **Таблица 1** выравнивается по правому краю и выделяется полужирным начертанием.

На следующей строке за словом **Таблица 1** следует название таблицы, которое набирается прямым начертанием и выравнивается по центру (без абзацного отступа).

Примечание к таблице располагается на следующей строке после таблицы. Слово **Примечание** выделяется полужирным начертанием, после него ставится точка. Текст примечания следует за словом **Примечание** и начинается с прописной буквы. Точка после текста примечания не ставится. Четко указывается размерность показателей. Цифры в таблицах должны соответствовать своему упоминанию в тексте статьи.

Не допускается размещение таблиц в конце статьи (перед списком литературы).

Информация о соблюдении требований Нагойского протокола

Если работа связана с исследованиями, в которых в качестве объекта используются генетические ресурсы (растения, животные, микроорганизмы), полученные от зарубежных партнеров, необ-

ходимо дать ссылку на Международно признанный сертификат о соблюдении (Internationally Recognized Certificate of Compliance) Нагойского протокола к Конвенции о биологическом разнообразии, подтверждающий легальное получение данных ресурсов.

Информация о соблюдении биоэтических стандартов

Если работа связана с исследованиями, в которых в качестве объекта используются лабораторные животные, то необходимо указать, соблюдались ли международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных.

Если в качестве объектов исследования выступает человек, то необходимо указать:

- соответствуют ли процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики;
- получено ли от каждого из включенных в исследование участников информированное добровольное согласие.

В конце статьи по желанию авторов приводится следующая справочная информация:

Общая информация о помощи в проведении работы и подготовке статьи: сообщения о предоставлении материалов, данных, компьютерного обеспечения, приборов во временное пользование; информация о проведении исследований в центрах коллективного пользования; помощь в технической подготовке текста; а также все прочее, что оценивается как полезная помощь. Информация о грантах и другой финансовой поддержке исследований. Авторы не должны использовать сокращенные названия институтов и спонсирующих организаций.

8. Список использованных источников

Оформляется в соответствии с приказом Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь от 25 июня 2014 г. № 159. Источники должны быть представлены в виде списка в порядке упоминания ссылок в тексте статьи. Нумерация — автоматическая.

Не допускаются ссылки на работы, которых нет в списке литературы, а также на неопубликованные материалы. В список использованных источников преимущественно следует включать работы не старше 10 лет (исключение составляют редкие высокоинформативные материалы).

9. На английском языке повторяются п. 2–6

10. Дата поступления статьи

К статье прилагаются:

1. Акт экспертизы о возможности опубликования в открытой печати.

2. Сопроводительное письмо, в структуре которого должны содержаться сведения о том, что:
– рукопись не находится на рассмотрении в другом издании;
– не была ранее опубликована.

Авторы несут ответственность за достоверность представленных в рукописи материалов.

3. Краткие сведения о каждом из авторов, включающие ФИО (полностью), год рождения, служебный адрес, адрес электронной почты, ученую степень, ученое звание, должность. Сведения об авторах предоставляются отдельным документом.

Бумажный экземпляр статьи подписывается всеми авторами.

Статья (в двух экземплярах) и сопроводительные документы представляются лично либо по почте на адрес: ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь. Электронная копия материалов направляется на электронный адрес: redactor@igc.by.

Редакция оставляет за собой право в процессе редакционной подготовки сокращать и исправлять рукопись по согласованию с автором.

Научное издание

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ

Том 30

Ответственный за выпуск *А. Л. Богданова*
Переводчик *М. Г. Пыжова*

Подписано в печать 12.04.2021. Формат 60×84^{1/8}. Бумага офсетная. Гарнитура Times.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 12,79. Уч.-изд. л. 7,52. Тираж 100 экз. Заказ № 8745.

Отпечатано в типографии Республиканского унитарного предприятия
«СтройМедиаПроект».
220123, г. Минск, ул. В. Хоружей, 13/61.

Оригинал-макет подготовлен в Государственном научном учреждении
«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/51 от 08.10.2013.
220072, г. Минск, ул. Академическая, 27.