

ISSN 1999-9127

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

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ
ТОМ 18**

Издается с 2005 года
Выходит два раза в год

Минск
2014

УДК [577.21 + 575] (082)

Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; редколл.: А.В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск: ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», 2014. – Т. 18. – 240 с. – ISSN 1999-9127.

Том 18 подготовлен в рамках сотрудничества Института генетики и цитологии НАН Беларуси с Институтом цитологии и генетики СО РАН и включает статьи по основным направлениям исследований институтов.

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. Хотылева – зам. главного редактора;
К.У. Вильчук, С.И. Гриб, О.Г. Давыденко, А.Н. Евтушенков, А.П. Ермишин,
Н.В. Павлючук, Н.В. Казаровец, А.И. Ковалевич, Г.И. Лазюк,
В.А. Лемеш, С.А. Лихачев, Н.П. Максимова, С.Б. Мельнов, М.Е. Михайлова,
И.Б. Моссэ, М.Е. Никифоров, В.Е. Падутов, В.Н. Решетников, Е.А. Сычева,
В.В. Титок, И.П. Шейко, О.Н. Харкевич – члены редколлегии;
И.В. Широкая – ответственный секретарь.

УДК [577.21 + 575] (082)

ISSN 1999-9127

ГНУ «Институт генетики
и цитологии НАН Беларуси», 2014

СОДЕРЖАНИЕ

<i>А.В. Кильчевский, В.А. Лемеш, Е.А. Сычева</i> Развитие геномных биотехнологий в Республике Беларусь: достижения и перспективы.....	7
<i>В.А. Лемеш, Е.В. Гузенко, Т.Е. Саматадзе, Е.В. Железнякова, Н.Л. Большеева, О.В. Муравенко</i> Генетическая трансформация льна	20
<i>И.Б. Моссэ</i> Генетическая диагностика – неотъемлемая часть персональной и превентивной медицины.....	31
<i>Н.В. Савина, Н.В. Никитченко, О.П. Романюк, Т.Д. Кужир, А.Л. Поляков, А.И. Ролевич, С.А. Красный, Р.И. Гончарова</i> Полиморфизм генов эксцизионной репарации ДНК как дополнительный фактор прогрессии рака мочевого пузыря: исследование на пациентах Беларуси.....	44
<i>Н.И. Дубовец, Е.А. Сычева</i> Микроэволюционная дифференциация полиплоидных видов злаков путем формирования рекомбинантных геномов	53
<i>И.Н. Леонова, Е.А. Салина, О.А. Орловская, Л.В. Хотылева, В.К. Шумный</i> Использование SSR-маркеров для характеристики гибридных линий мягкой пшеницы с генетическим материалом <i>T. durum</i> и <i>T. dicoccum</i>	61
<i>М.Е. Михайлова, Ю.В. Войтюховская</i> Оценка генетической структуры беловежского зубра (<i>Bison bonasus</i> L.) по одиночным нуклеотидным заменам генов <i>DRB3</i> и <i>DQB</i> главного комплекса гистосовместимости.....	70
<i>Я.И. Шейко, О.В. Квитко, И.И. Конева, Н.А. Балащенко, А.И. Будевич, С.Е. Дромашко</i> Исследование эффектов рекомбинантного лактоферрина человека на пролиферацию и апоптоз раковых и иммортализованных клеток	77
<i>Ю.Л. Орлов, Г.В. Васильев, Е.В. Кулакова, Н.А. Колчанов</i> ChIP-seq данные и их анализ	84
<i>Н.Б. Рубцов, Ю.М. Минина, Н.С. Жданова</i> Морфофункциональная организация теломер млекопитающих.....	98
<i>О.В. Трапезов</i> Генетические основы domestikации	118
<i>О.Л. Серов</i> Трансгенез как эффективный способ модификации геномов животных	133

<i>В.Н. Максимов, М.И. Воевода, Ю.В. Максимова</i> Роль исследования ДНК в оценке индивидуального риска развития болезни	143
<i>А.С. Пилипенко</i> Палеогенетика: происхождение человека и этногенетические реконструкции	148
<i>Е.Н. Макеева, Н.В. Минченко</i> Нагойский протокол – международный механизм регулирования использования генетических ресурсов	162
ПОЛОЖЕНИЕ о Национальном координационном центре по вопросам доступа к генетическим ресурсам и совместного использования выгод.....	167
ПОЛОЖЕНИЕ о контрольном пункте мониторинга и использования генетических ресурсов..	172
Нагойский протокол регулирования доступа к генетическим ресурсам и совместного использования на справедливой и равной основе выгод от их применения к конвенции о биологическом разнообразии	175
Рефераты.....	229
Правила оформления статьи.....	238

CONTENTS

<i>A.V. Kilcheuski, V.A. Lemesh, Ye.A. Sycheva</i> Development of Genomic Biotechnologies in the Republic of Belarus: Achievements and Prospects.....	7
<i>V.A. Lemesh, Ye.V. Guzenko, T.Ye. Samatadze, Ye.V. Zheleznyakova, N.L. Bolsheva, O.V. Muravenko</i> Genetic Transformation of Flax.....	20
<i>I.B. Mosse</i> Genetic Diagnostics – an Integral Part of Personal and Preventive Medicine	31
<i>N.V. Savina, N.V. Nikitcheko, O.P. Ramaniuk, T.D. Kuzhir, A.L. Polyakov, A.I. Rolevich, S.A. Krasny, R.I. Goncharova</i> Polymorphism of Excision Repair Genes as an Additional Factor of Bladder Cancer Progression: the Study in the Patients of Belarus.....	44
<i>N.I. Dubovets, Ye.A. Sycheva</i> Microevolutionary Differentiation of Cereals Polyploid Species by Recombinant Genome Formation.....	53
<i>I.N. Leonova, E.A. Salina, O.A. Orlovskaya, L.V. Khotyleva, V.K. Shumny</i> Characterization of Common Wheat Hybrid Lines with <i>T. durum</i> and <i>T. dicoccum</i> Genetic Material by SSR Markers	61
<i>M.Ye. Mikailova, Yu. V. Voytyukhovskaya</i> Evaluation of Genetic Structure of European Bison (<i>Bison bonasus</i> L.) by a Single Nucleotide Polymorphism Genes <i>DRB3</i> and <i>DQB</i> of Major Histocompatibility Complex (MHC)	70
<i>Y.I. Sheiko, O.V. Kvitko, I.I. Koneva, N.A. Balashenko, A.I. Budevich, S.E. Dromashko</i> Study on Effects of Recombinant Human Lactoferrin on Proliferation and Apoptosis of Cancer and Immortalized Cells.....	77
<i>Y.L. Orlov, G.V. Vasiliev, E.V. Kulakova, N.A. Kolchanov</i> ChIP-seq Data and Their Analysis.....	84
<i>N.B. Rubtsov, J.M. Minina, N.S. Zhdanova</i> Morphofunctional Organization of Mammalian Telomeres	98
<i>O.V. Trapezov</i> Genetic Bases of Domestication.....	118
<i>O.L. Serov</i> Transgenesis as an Effective Approach of Animal Modification	133

<i>V.N. Maximov, M.I. Voevoda, J.V. Maximova</i> The Role of DNA Testing in the Assessment of Individual Risk of Developing the Disease....	143
<i>A.S. Pilipenko</i> Paleogenetics: Human Origin and Ethnogenetic Reconstructions	148
<i>E.N. Makeyeva, N.V. Minchenko</i> The Nagoya Protocol – International Mechanism for Regulation of Genetic Resources Use ...	162
REGULATIONS for the National Coordination Centre for Access to Genetic Resources and Benefit-Sharing.....	167
REGULATIONS for a Check Point of Monitoring the Utilization of Genetic Resources.....	172
Nagoya Protocol on Access to Genetic Resources and the Fair and Equitable Sharing of Benefits Arising from Their Utilization to the Convention on Biological Diversity.....	175
Summaries	229
Instructions to Authors.....	238

РАЗВИТИЕ ГЕНОМНЫХ БИОТЕХНОЛОГИЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ: ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Обзорная статья

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Геномные биотехнологии – современное направление биотехнологии, получившее интенсивное развитие благодаря успехам геномики в изучении структуры и функций геномов живых организмов. Достижения геномики и молекулярной биологии вооружили биотехнологию новыми научно-технологическими подходами, существенно расширив границы применения биологических процессов и биообъектов для нужд человеческого общества, открыв новые возможности для:

- создания и использования принципиально новых и улучшенных генотипов растений, животных и микроорганизмов, а также совершенствования селекционного процесса и методов ведения сельского хозяйства;
- повышения уровня развития здравоохранения и снижения расходов за счет более точной диагностики, своевременной профилактики и индивидуализации процесса лечения; разработки нового поколения фармакологических препаратов, генной и таргетной терапии;
- развития спорта за счет совершенствования системы отбора и подготовки спортсменов с учетом их индивидуальных особенностей;
- повышения эффективности природоохранной деятельности и др.

В Республике Беларусь биотехнология рассматривается как отрасль народного хозяйства. По инициативе Правительства Республики Беларусь приняты Концепция развития фармацевтической и биотехнологической промышленности Республики Беларусь на 2011–2015 годы и на период до 2020 года и План развития биотехнологической отрасли Республики Беларусь на 2012–2015 годы и на период до 2020 года.

Развитию прикладных геномных исследований, направленных на разработку геномных биотехнологий, способствовало признание биотехнологии приоритетным направлением научно-технической деятельности и формирование целевых про-

грамм: государственной комплексной целевой научно-технической программы «Биологические технологии и биобезопасность» (2006–2010 гг.), государственной программы «Инновационные биотехнологии» (2010–2012 гг. и на период до 2015 г.), межгосударственной целевой программы Евразийского экономического сообщества «Инновационные биотехнологии» на 2011–2015 гг. (подпрограмма 1 «Инновационные биотехнологии в Республике Беларусь»). В рамках данных программ по направлению «геномные биотехнологии» работают учреждения Национальной академии наук Беларуси (Институт генетики и цитологии, Институт биофизики и клеточной инженерии, Институт биоорганической химии, НПЦ по биоресурсам, Институт микробиологии, НПЦ по картофелеводству и плодоовощеводству, НПЦ по земледелию, НПЦ по животноводству), Минздрава (НИИ эпидемиологии и микробиологии, РНПЦ «Мать и дитя», РНПЦ детской онкологии и гематологии, РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н.Александрова, БГМУ) и Минобразования (БГУ, БГТУ).

Результатом реализации государственных программ стала разработка целого ряда геномных биотехнологий для различных отраслей народного хозяйства.

Геномные биотехнологии для сельского хозяйства

Сельское хозяйство входит в число наиболее перспективных сфер применения геномных биотехнологий. Достижения геномики и молекулярной биологии стали основой новых методов селекционной работы, основанных на использовании молекулярных маркеров и целевой генно-инженерной модификации.

Данное направление исследований активно развивается в научных центрах Беларуси. Специалистами Института генетики и цитологии НАН Беларуси разработаны и успешно приме-

няются в селекционной практике технологии ДНК-маркирования, позволяющие оценить качество исходного селекционного материала по наличию желательных для селекционера генов и контролировать их в процессе выведения новых сортов растений с заданными свойствами. Маркер-ассоциированная селекция ведется по 9 сельскохозяйственным культурам (пшеница, тритикале, картофель, томат, лен, рапс, яблоня, ячмень, соя). Выявлены ДНК-маркеры к генам устойчивости картофеля к болезням и вредителям (нематода), маркеры для MAS селекции картофеля по признаку «содержание редуцирующих сахаров» [1–4]. Разработана технология ДНК-тестирования генов лежкости и содержания каротиноидов в плодах томата, а также генов устойчивости к кладоспориозу и фузариозу [5–8]. Подобраны ДНК-маркеры, сцепленные с генами устойчивости яблони к парше, мучнистой росе, красногалловой яблонной тле и бактериальному ожогу [9–11]. Определен состав аллелей генов, влияющих на сроки созревания и хранения плодов яблони [9]. Протестированы серии молекулярных маркеров к генам, определяющим устойчивость к бурой ржавчине у пшеницы, хлебопекарные качества, короткостебельность, устойчивость к предуборочному прорастанию у пшеницы и тритикале [12–19]. Подобраны ДНК-маркеры к генам, контролирующим синтез эруковой кислоты у рапса; определяющим содержание клетчатки, линолевой и линоленовой кислот в семенах рапса [20–25]. Разработаны технологии маркер-ассоциированной селекции по генам фотопериодической реакции и структуры листового аппарата сои [26]. Совместно с НПЦ НАН Беларуси по земледелию разработан способ ДНК-маркирования пивоваренного ячменя, позволяющий проводить дифференцировку сортообразцов на кормовой/пивоваренный [27–28]. На стадии разработки находятся геномные биотехнологии, позволяющие оценить аллельный состав генов, определяющих устойчивость пшеницы к септориозу, пиренофорозу, стеблевой и желтой ржавчине. В Институте леса НАН Беларуси активно ведутся работы по ДНК-маркированию генов, кодирующих хозяйственно важные признаки хвойных пород растений.

На основе ДНК-маркеров разработаны системы генетической паспортизации для 10 сельскохозяйственных культур (пшеница, картофель, ячмень, лен, томат, соя, под-

солнечник, груша, яблоня, сахарная свекла) [29–38]. Для каждого вида подобраны панели SSR-маркеров, охватывающие различные области генома и достаточные для идентификации сортов и линий. С применением разработанной технологии составлены эталонные генетические паспорта 38 сортов пшеницы, 60 сортов картофеля, 33 сортов и гибридов томата и 39 сортов льна отечественной и зарубежной селекции. ДНК-паспорта позволяют проводить проверку соответствия новых сортов критериям ООС-теста при их регистрации; оценивать генетическую новизну сортов, линий и гибридов; оценивать соответствие партий семян стандарту; подтверждать кондиционность семян, закупаемых за рубежом; исключить возможность фальсификации сортов и связанных с этим экономических потерь; улучшить систему патентования новых сортов; решать спорные вопросы об авторстве сортов и их чистоте. Подобрана панель из 12 микросателлитных маркеров для оценки чистоты и типичности инбредных линий кукурузы [39].

Востребованы на практике разработки отечественных ученых (Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, НПЦ НАН Беларуси по животноводству) по ДНК-тестированию сельскохозяйственных животных по генам, определяющим устойчивость к иммунодефициту, пороку позвоночника и ранней abortируемости эмбрионов крупного рогатого скота; устойчивость к иммунодефициту и параличу лошадей; устойчивость к колибактериозу и стрессу свиней; генам откормочной и мясной продуктивности свиней; многоплодия у свиноматок; молочной продуктивности крупного рогатого скота, содержания жира и белка в молоке [40–46]. Предложен метод ДНК-типирования крупного рогатого скота по гену β -лактоглобулина с целью выявления в популяции аллеля $B\text{-}\beta LG$, ассоциированного с получением гипоаллергенного молока, для производства диетической продукции. Для подтверждения происхождения племенных животных разработана и успешно внедряется на базе областных племпредприятий республики технология ДНК-паспортизации крупного рогатого скота [47]. Ведется работа над созданием технологии ДНК-паспортизации племенных хряков.

Об эффективности использования геномных технологий для сельского хозяйства республики свидетельствует тот факт, что, благодаря ДНК-тестированию белорусской популяции чернопестрой породы крупного рогатого скота по гену иммунодефицита и исключению носителей из селекционного процесса, частота встречаемости скрытых носителей дефектного аллеля в течение 2006–2010 гг. снизилась у быков-производителей с 6,6% до 1,3%. Использование высокоточных методов тестирования в селекции позволяет разработать эффективную программу улучшения селекционно-племенного поголовья скота, способствует интенсификации селекционного процесса по созданию высокопродуктивных сельскохозяйственных животных, избавляет от излишних затрат и финансовых потерь.

Разработаны эффективные методики дифференциации биотехнологически ценных микроорганизмов на основании молекулярно-генетического анализа, позволяющие уточнить их таксономическое положение. Точная

таксономическая идентификация биотехнологически ценных микроорганизмов является необходимым этапом при разработке новых биотехнологий и продвижении их на международные рынки.

Широкие возможности для создания принципиально новых генотипов открывает генетическая инженерия. В настоящее время научные исследования в области генетической инженерии растений в Беларуси ведутся по целому ряду направлений на базе организаций НАН Беларуси и ВУЗов (см. табл.).

Получены первичные трансгенные растения картофеля с устойчивостью к колорадскому жуку, вирусам, грибным и бактериальным болезням; клевера с повышенной урожайностью; клюквы с повышенной резистентностью к патогенам и измененным вкусом плодов [48–53]. Отрабатываются технологии генной модификации рапса и льна. Ведутся работы по генно-инженерной реконструкции интродуцированных в республике ягодных культур – голубики высокой и брусники обыкновенной и

Направления исследований по генетической инженерии растений в Беларуси

Культура	Эффект	Организация
Картофель	Устойчивый к Y-вирусу	НПЦ НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству
	Устойчивый к некоторым грибным болезням	Институт генетики и цитологии НАН Беларуси Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси
	Устойчивый к насекомым	Институт генетики и цитологии НАН Беларуси
	Синтезируются антимикробные пептиды	Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси НПЦ НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству
Рапс	Синтезируется белок куриного интерферона	Белорусский государственный университет Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси
	Устойчивый к глифосату	Белорусский государственный университет Институт генетики и цитологии НАН Беларуси
Лен-долгунец	Модифицированное строение клеточной стенки	Институт генетики и цитологии НАН Беларуси Институт льна НАН Беларуси Белорусский государственный технологический университет
Клевер луговой	Повышенная урожайность	Центральный ботанический сад НАН Беларуси Ин-т экспериментальной ботаники НАН Беларуси
Клюква	Улучшенные вкусовые качества	Центральный ботанический сад НАН Беларуси
Табак, арабидопсис	Устойчивые к тяжелым металлам и нефтепродуктам	Институт генетики и цитологии НАН Беларуси
Табак	С ускоренным развитием и повышенной продуктивностью	Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

цветочно-декоративной культуры – гиацинта восточного [54–55]. Ввод в эксплуатацию в 2012 году при Институте генетики и цитологии НАН Беларуси специального опытного поля для испытания трансгенных растений при их первом высвобождении в окружающую среду позволит перейти к следующей стадии работы с созданными генно-модифицированными организмами.

Благодаря совместным исследованиям НПЦ НАН Беларуси по животноводству и российских ученых совершен прорыв в создании генетически модифицированных животных. В ходе реализации союзных программ «БелРосТрансген» и «БелРосТрансген-2» были получены первичные трансгенные животные (козы с геном лактоферрина человека); создано стадо животных-продуцентов; разработаны методики выделения, очистки и лиофильной сушки рекомбинантного лактоферрина человека из молока животных-продуцентов. В настоящее время ведутся работы по созданию лекарственных и пищевых средств на основе лактоферрина с организацией их производства. С этой целью разработана новая программа «БелРосФарм» в рамках Союзного государства.

Обширные сведения по секвенированию геномов успешно используются для разработки технологий создания генно-инженерных бактериальных штаммов-суперпродуцентов для фармакологической промышленности. В Институте генетики и цитологии совместно с Институтом микробиологии получены генно-инженерные векторы экспрессии тимидинфосфорилазы, уридинфосфорилазы и пуридинфосфорилазы и соответствующие штаммы-суперпродуценты, показавшие 10–20-кратное увеличение эффективности биосинтеза ферментов в сравнении с исходным штаммом. Данные ферментные препараты являются важным звеном в синтезе фармативных «Лейкладин», «Флударабел» и «Гуаран», а также других фармацевтически важных нуклеозидов. В Белорусском государственном университете разработаны генно-инженерные подходы получения штаммов-продуцентов биологически активных соединений – фитогормонов, антибиотиков и пигментов на основе ризосферных бактерий рода *Pseudomonas*.

Геномные биотехнологии для медицины и спорта

Мировой опыт показывает, что, несмотря на большие расходы, связанные с разработкой и внедрением новейшего медицинского лечебно-диагностического оборудования и фармпрепаратов, уровень общей заболеваемости не снижается. В связи с этим, в современном мире наибольшую перспективу приобретает медицина прогноза и молекулярной диагностики, которая, на основе индивидуального строения генома человека и особенностей обменных процессов его организма, может дать правильный прогноз в отношении возможного развития определенных болезней или патологических процессов.

Внедрение геномных подходов в медицину позволит сменить парадигму развития здравоохранения: перейти от болезнь-ориентированной системы к «4П-медицине» – партнёрской, прогностической, профилактической и персонализированной, что уже сегодня является магистральным направлением совершенствования систем здравоохранения США и Евросоюза. Одним из ключевых элементов такой медицины является как можно более раннее выявление с помощью технологий геномного анализа генетических индивидуальных предрасположенностей пациента к заболеваниям и индивидуальных генетически детерминированных особенностей реакции на лекарственные препараты. На основе данных геномного анализа составляются индивидуальные рекомендации по профилактике развития заболеваний, а в случае обнаружения заболевания выбирается наиболее эффективная схема лечения с учетом генетически детерминированных индивидуальных особенностей реакции на лекарственные препараты.

Республика Беларусь также предпринимает меры по внедрению новейших геномных биотехнологий в национальную систему здравоохранения с целью ее совершенствования в соответствии с мировыми тенденциями развития медицинской и биологической науки. Значительный прогресс достигнут в идентификации генов, аллельные варианты которых изменяют риск развития болезней. В Институте генетики и цитологии НАН Беларуси (совместно с РНПЦ «Мать и дитя», РНПЦ «Кардиология», РНПЦ гигиены, Бел-

МАПО, БГМУ) разработаны методы ДНК-диагностики генетической предрасположенности к многофакторным заболеваниям, таким, как сердечно-сосудистые заболевания (тромбофилии, ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда и др.); венозные тромбозы (тромбофлебиты); болезни органов дыхания (бронхиальная астма); эндокринные заболевания (сахарный диабет 2 типа); болезни метаболизма костной ткани (остеопороз, ревматоидный артрит); нарушения нормального физиологического течения беременности (невынашивание беременности, гестозы, резус-конфликт) [56–65]. По разработкам института развернута ДНК-диагностика врожденной или наследственной тугоухости, митохондриальных патологий, гемохроматоза (нарушение обмена железа) [66–74]. Для более эффективного внедрения ДНК-диагностики редких митохондриальных заболеваний в клиническую практику создана специальная компьютерная программа для врачей «Белмитокомбат», в которой собраны описания всех синдромов с детальными иллюстрациями. Предполагается, что программа окажет значительную помощь практикующим врачам в диагностике митохондриальных заболеваний у пациентов.

Для населения Беларуси изучено влияние генетических факторов на формирование ранней алкогольной зависимости и совместно с РНПЦ психического здоровья разработаны методические пособия по диагностике быстро формирующейся алкогольной зависимости [75–77]. Ведется разработка геномных технологий выявления генетической предрасположенности к кардиомиопатиям, ожирению, шизофрении [78–84]. Разрабатывается программа диагностики генетически обусловленных форм мужского бесплодия. Изучается связь комбинаций полиморфных вариантов генов с предрасположенностью к возникновению различных форм рака [85–88]. Проводятся исследования по созданию фармакогенетических тестов для оптимизации дозировки лекарственных препаратов. Уже предложен для внедрения в медицинские учреждения метод индивидуализированного лечения блокаторами рецепторов ангиотензина II пациентов с гипертрофической кардиомиопатией [89]. Подобраны ДНК-маркеры для генотипирования тяжело больных шизофрени-

ей лиц с целью подбора лекарственных препаратов и их доз для более эффективного ответа на фармакотерапию.

В некоторых случаях по результатам массовой ДНК-диагностики могут быть даны общие рекомендации для системы здравоохранения. Так в ходе анализа по генам тугоухости более 600 человек установлено, что в Беларуси наблюдается самый высокий процент (5,68%) гетерозиготных носителей мутации *35delG* гена *GJB2* (основная генетическая причина заболевания) среди всех исследованных к настоящему моменту стран Европы. Это делает целесообразным определение скрытого носительства данной мутации у жителей страны, находящихся в репродуктивном возрасте, для прогноза опасности появления неслышащего потомства.

Молекулярно-генетические исследования генов, наследственно-ассоциированных с высоким риском развития злокачественных новообразований, проводятся в ведущих онкологических центрах республики – РНПЦ детской онкологии и гематологии, РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н.Александрова. В РНПЦ детской онкологии и гематологии ведутся исследования по разработке генно-инженерных технологий для получения противораковых вакцин, изучаются способы оценки экспрессии генов и их мутаций для назначения мишень-направленной («таргетной») терапии при злокачественных заболеваниях.

Исследования в области геномики человека, свидетельствующие о несомненном вкладе генетических факторов в формирование, развитие и проявление физических качеств, привели к появлению нового направления – геномики спорта. В последние годы работы такого плана получили развитие в Беларуси в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси, Институте биоорганической химии НАН Беларуси, Полесском государственном университете. В Институте генетики и цитологии по результатам ДНК-паспортизации представителей 19-ти олимпийских и национальных команд Беларуси по разным видам спорта разработана система тестирования по генам, ассоциированным со спортивной успешностью и устойчивостью к физическим нагрузкам, позволяющая корректно отбирать кандидатов для видов спорта

разной направленности, планировать тренировочный процесс с учетом индивидуальных генотипических особенностей спортсменов, а также корректировать их индивидуальное медико-биологическое обеспечение [90–92]. Подготовка атлетов с учетом их индивидуальных особенностей дает возможность достичь высоких спортивных результатов, сохранив здоровье спортсменов; повысить эффективность расходования государственных средств, выделенных на развитие физкультуры и спорта.

Геномные биотехнологии для охраны окружающей среды

Геномные подходы нашли широкое применение как инструмент для изучения генетического разнообразия и структуры популяций живых организмов. С помощью молекулярных маркеров можно получить ценную информацию для измерения процессов, происходящих в экосистемах, что является важным для оценки состояния популяций, мониторинга результатов содержания видов на охраняемых территориях или проверки результатов пространственных связей между заповедниками.

Начаты такие работы и в Беларуси. В Институте генетики и цитологии предложен молекулярный подход для оценки генетического состояния популяций диких животных, находящихся на грани вымирания, а также искусственно восстановленных видов. На его основе впервые был проведен ДНК-анализ популяции беловежского зубра, результаты которого положены в основу Плана мероприятий по сохранению и рациональному использованию зубров на 2010–2014 годы [93–94]. В настоящее время в рамках данного плана продолжается молекулярно-генетическое изучение современных микропопуляций зубра в целях увеличения их гетерогенности и уменьшения инбридинга. По итогам реализации исследования предполагается разработка молекулярно-генетического паспорта зубра и типовых правил ведения селекционно-племенной работы с животными. Исследования в данном направлении также планируется продолжить в Программе Союзного государства «Разработка концепции сохранения и формирования оптимального современного ареала европейского зубра в России и Беларуси и рекомендации по дальнейшему управлению популяциями» («Европейский зубр»).

Геномные подходы использованы для изучения популяций больших белоголовых чаек, благородного оленя и косули [95]. Для ряда охраняемых и ресурсных видов (европейский зубр, европейская косуля, благородный олень, дикий кабан) подобраны ДНК-маркеры, позволяющие с высокой степенью достоверности идентифицировать биологический материал, установив его видовую принадлежность, что может применяться для борьбы с браконьерством.

Сохранение генетических ресурсов

Динамичное развитие геномных исследований неразрывно связано с вопросами мобилизации и сохранения генетических ресурсов с целью их дальнейшего использования. В настоящее время эта проблема решается не только на государственном уровне, но и на уровне международных соглашений, регулирующих обмен генетическими ресурсами между странами мира, таких как Конвенция о биологическом разнообразии и Нагойский протокол регулирования доступа к генетическим ресурсам и совместного использования на справедливой и равной основе выгод от их применения.

Одно из новых актуальных направлений в сфере сохранения генетических ресурсов – это создание биобанков ДНК, представляющих собой коллекции образцов ДНК (РНК) и биологического материала различных организмов, предназначенные для длительного хранения в специально оборудованных помещениях. Сегодня данное направление развивается как самостоятельная область исследования со многими специфическими компонентами, требующая разработки теоретических основ формирования, оптимизации и поддержания фондов. Формирование биобанков ДНК представляется чрезвычайно важным как для сохранения биологического разнообразия, так и для создания депо биологического материала, пригодного для исследования различными методами как сейчас, так и в будущем.

В Республике Беларусь для обеспечения сохранности уникальных коллекций ДНК на базе Института генетики и цитологии НАН Беларуси создан Республиканский Банк ДНК человека, животных, растений и микроорганизмов (далее – Республиканский Банк ДНК). На данный момент в Республиканском Банке ДНК

накоплено более 8 тыс. образцов ДНК человека, животных, растений и микроорганизмов. Образцы сгруппированы в специализированные коллекции (популяционные, болезнь-ориентированные и пр.) и представляют собой ценнейшие генетические ресурсы. Создание и систематическое пополнение Республиканского Банка ДНК будет способствовать росту конкурентоспособности отечественных работ в области медицины, сельского хозяйства, охраны окружающей среды и биотехнологической промышленности. Генетические ресурсы биобанка могут быть также использованы для сотрудничества при выполнении международных научно-исследовательских проектов и взаимовыгодного обмена в рамках международных договоров.

Освоение геномных биотехнологий

Благодаря государственной поддержке за последние годы предприняты шаги по созданию инновационной инфраструктуры и формированию отечественного рынка производства и потребления в сфере геномных биотехнологий.

Сегодня ключевую роль в этом процессе играет Республиканский центр по генетическому маркированию и паспортизации растений, животных, микроорганизмов и человека при Институте генетики и цитологии НАН Беларуси (Республиканский центр геномных биотехнологий). Он призван решить проблему коммерциализации геномных разработок и ориентирован на оказание услуг учреждениям Минсельхозпрода, Минздрава, Минспорта, Минприроды, а также другим юридическим и физическим лицам. В центре можно пройти обследование на предрасположенность к болезням, определить, на какой вид спорта лучше генетически «сориентирован» организм, узнать этногеографический диапазон происхождения предков по отцовской и материнской линии. Специалисты центра с помощью технологии ДНК-маркирования окажут помощь в оценке селекционного материала по наличию генов, ответственных за хозяйственно ценные признаки и заболевания сельскохозяйственных растений и животных, подтвердят происхождение племенных животных и семенного материала. Аккредитация центра распространяется также на поиск генетически модифицированных ингредиентов в продовольственном

сырье и пищевых продуктах, сельскохозяйственной продукции, кормах и в семенном материале. Несмотря на весьма короткий срок работы (центр введен в эксплуатацию в 2011 году), в Республиканском центре выполнено более 25 тысяч генетических анализов.

Заключение

Модернизация современного общества неотъемлемо связана с активной разработкой и внедрением новых приложений в области биотехнологических исследований, и геномные биотехнологии в этом процессе играют немаловажную роль, внося свой вклад в формирование биоэкономики.

В Беларуси сделаны только первые шаги в этом направлении. Уже сегодня, благодаря открытию Республиканского центра геномных биотехнологий, геномное тестирование стало общедоступным как для учреждений, так и для физических лиц. Однако создание условий для перехода к биоэкономике подразумевает масштабное и повсеместное внедрение геномных биотехнологий в отрасли народного хозяйства, что позволит коренным образом изменить существующие подходы к созданию и производству сельскохозяйственной, продовольственной, фармацевтической и иной продукции, создаст альтернативные пути решения многих проблем, связанных с охраной здоровья и использованием природных ресурсов.

Список использованных источников

1. Оценка селекционного материала картофеля на наличие гена *H1* устойчивости к патотипу Ro1 цистообразующей нематоды *Globodera rostochiensis* с помощью ПЦР-маркера *CP113* / Е.В. Воронкова [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. бiял. навук. – 2007. – № 4. – С. 1–12.
2. Использование ПЦР-анализа для идентификации генов устойчивости картофеля к *Globodera rostochiensis* / Н.В. Павлючук [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. бiял. навук. – 2010. – № 2. – С. 36–41.
3. Оценка исходного материала картофеля для селекции на устойчивость к болезням и вредителям с помощью специфических ПЦР-маркеров: методические рекомендации / А.П. Ермишин [и др.]. – Минск: Право и экономика, 2010. – 60 с.

4. Методы вовлечения в селекцию 1 EBN диких диплоидных видов картофеля и скрининга селекционного материала на наличие генов устойчивости к фитофторозу: методические рекомендации / А.П. Ермишин [и др.]. – Минск: Право и экономика, 2014. – 58 с.
5. Аджиева, В.Ф. Оценка комбинационной способности по признакам продуктивности форм томата (*Solanum lycopersicum* L.), несущих гены биосинтеза каротиноидов и длительности созревания плодов / В.Ф. Аджиева, Л.А. Мишин, А.В. Кильчевский // Молодежь в науке – 2011: прил. к журн. «Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. бiял. навук». – Минск: Беларус. навука, 2012. – С. 3–6.
6. Создание сортов и гибридов томата с одновременной устойчивостью к пониженным температурам и болезням с использованием гаметной селекции и молекулярного анализа / И.Е. Зайцева [и др.] // Селекция и семеноводство овощных культур: сб. науч. тр. – М.: ВНИИССОК, 2014. – Вып. 45. – С. 276–286.
7. Отбор форм томата с заданной комбинацией генов (*nor/nor//og^c/og^c* и *nor⁺/nor⁺//og^c/og^c*) среди гибридов F₂ методом фрагментного анализа / В.Ф. Аджиева [и др.] // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии: материалы Междунар. науч. конф., посвящ. памяти академика РАСХН Г.С. Муромцева, Москва, 11 апреля 2012 г. – ВНИИСХБ. – Москва, 2012. – С. 5–6.
8. Картирование локуса Cf-6 устойчивости к кладоспориозу томата с помощью SSR-маркеров / З.Е. Грушецкая [и др.] // Генетика. – 2007. – Т. 43, № 11. – С. 1511–1517.
9. Урбанович, О.Ю. Молекулярные методы идентификации и генотипирования яблони и груши. – Минск: Право и экономика, 2013. – 210 с. – ISBN 978-985-522-231-8.
10. Urbanovich, O. Identification of scab resistance genes in apple trees by molecular markers / O. Urbanovich, Z. Kazlouskaya // Sodininkyste ir darzininkyste. – 2008. – Vol. 27, № 2. – P. 347–357.
11. Оценка потенциала устойчивости к парше яблони гибридных потомств *M. sieboldii* и *M. ×zumi* / З.А. Козловская [и др.] // Плодоводство и ягодоводство России: сб. науч. работ ВСТИСП РАСХН; редкол.: И.М. Куликов [и др.]. – Москва, 2011. – Т. XXVIII, Ч. 1. – С. 282–288.
12. Булойчик, А.А. Маркирование эффективных генов устойчивости к бурой ржавчине у высокоустойчивых образцов мягкой яровой пшеницы / А.А. Булойчик, Т.В. Долматович, В.С. Борзяк // Доклады НАН Беларуси. – 2012. – Т. 56, № 5. – С. 78–81.
13. Долматович, Т.В. ДНК-технология идентификации генов устойчивости пшеницы к возбудителю бурой ржавчины: методические рекомендации / Т.В. Долматович, А.А. Булойчик. – Минск: ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», 2013. – 64 с.
14. Скрининг селекционного материала мягкой яровой пшеницы на наличие генов устойчивости к возбудителю бурой ржавчины / А.А. Булойчик [и др.] // Земледелие и селекция в Беларуси: сб. науч. тр. – 2013. – Вып. 49. – С. 291–300.
15. Идентификация аллельных вариантов генов пуриноидинов *PinA* и *PinB* в коллекции сортов и линий яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) / Е.А. Фомина [и др.] // Молодежь в науке – 2011: прил. к журн. «Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. бiял. навук». – Минск: Беларуская навука, 2012. – С. 183–185.
16. Идентификация аллельных вариантов гена *Vp-1*, контролирующего предуборочное прорастание семян, у сортов и линий мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) / Е.А. Фомина [и др.] // Молодежь в науке – 2011: прил. к журн. «Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. бiол. навук». – Минск: Беларуская навука, 2014. – Ч. 4. – С. 170–173.
17. Распространение 1BL.1RS транслокации в коллекции сортов и линий озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) / Е.А. Фомина [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси. – Минск, 2014. – Т. 17. – С. 53–60.
18. Дубовец, Н.И. Анализ аллельного состава генов короткостебельности у гексаплоидных тритикале (*×Triticosecale* Wittmack) / Н.И. Дубовец [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. бiял. навук. – 2014. – № 1. – С. 61–66.
19. Зайцева, О.И. Изучение аллельного состава высокомолекулярных субъединиц глютеина у дигаплоидных линий ярового

гексаплоидного тритикале / О.И. Зайцева // Молодежь в науке – 2011: прил. к журн. «Весці Нац. Акадэміі навук Беларусі». В 5 ч. Ч. 3. / редкол.: И.Д. Волотовский [и др.]. – Минск, 2012. – С. 57–62.

20. Грушецкая, З.Е. Создание dCAPS-маркеров к генам FAE1.1, контролирующим синтез эруковой кислоты у рапса (*Brassica napus* L.). / З.Е. Грушецкая, В.А. Лемеш, Л.В. Хотылева // Доклады НАН Беларуси. – 2013. – Т. 57, № 4. – С. 105–109.

21. Способ идентификации генов FAE1.1, контролирующих содержание эруковой кислоты в масле семян рапса, с помощью dCAPS-маркеров / З.Е. Грушецкая, Г.В. Мозгова, В.А. Лемеш, А.В. Бакановская, Я.Э. Пилюк. – Патент Российской Федерации на изобретение № 2486254 от 12.04.2012.

22. Методические рекомендации по идентификации генов, контролирующих синтез эруковой кислоты у рапса (*B. napus* L.), с использованием ДНК-маркеров / З.Е. Грушецкая [и др.]. – Минск: Право и экономика, 2013. – 35 с.

23. Методические рекомендации по оценке и отбору селекционного материала рапса по уровню содержания ненасыщенных жирных кислот, определяющих качество масла, с помощью ДНК-маркеров / В.А. Лемеш [и др.]. – Минск: Право и экономика, 2013. – 31 с.

24. Идентификация мутантных аллелей генов FAD2 и FAD3C в сортах ярового рапса (*Brassica napus* L.) белорусской селекции / В.А. Лемеш [и др.] // Доклады НАН Беларуси. – 2011. – Т. 55, № 3. – С. 88–91.

25. Intraspecific chromosomal and genetic polymorphism in *Brassica napus* L. detected by cytogenetic and molecular markers / A.V. Amosova [et al.] // Journal of Genetics. – 2014. – Vol. 93, № 1. – P. 1–11.

26. Prospects of exploiting of photoperiod sensitivity gene *E₇* in early soybean breeding and revealing of its sources with SSR-markers / V.E. Rozenzweig [et al.] // Soybean Genetics Newsletter. – 2008. – Vol. 35.

27. Определение доноров термостабильных аллелей β-амилазы ячменя / Н.В. Луханина [и др.] // Генетика. – 2010. – Т. 46, № 1. – С. 127–130.

28. Поиск Sd3/Sd2H аллелей высокотермостабильной β-амилазы у стародавних сортов

ячменя / Н.В. Луханина [и др.] // Материалы конференции «Современные методы использования генетических ресурсов в селекции ячменя и овса», г. Санкт-Петербург, 1–5 июля 2013 года в Сборнике «Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции; генетические ресурсы овса, ржи, ячменя». – Санкт-Петербург; ГНУ ВИР им. Вавилова – 2013. – Т. 171. – С. 17–20.

29. Малышев, С.В. Идентификация и паспортизация сортов сельскохозяйственных культур (мягкой пшеницы, картофеля, льна и свеклы) на основе ДНК маркеров: методические рекомендации / С.В. Малышев, О.Ю. Урбанович, Н.А. Картель. – Минск, 2006. – 27 с.

30. Кондратюк, А.В. Анализ полиморфизма микросателлитных локусов сортов картофеля белорусской и иностранной селекции / А.В. Кондратюк, Е.И. Кузьминова, А.В. Кильчевский // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. – Минск: Право и экономика, 2012. – Т. 13. – С. 25–29.

31. Использование микросателлитных маркеров для анализа коллекции сортов пшеницы (*Triticum aestivum* L.) / Е.А. Фомина [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2014. – № 3. – С. 31–37.

32. Полиморфизм микросателлитных локусов льна (*Linum usitatissimum* L.) как основа генетической паспортизации сортов / В.А. Лемеш [и др.] // Доклады НАН Беларуси. – 2013. – Т. 57, № 2. – С. 74–78.

33. Генетический полиморфизм сортов льна (*Linum usitatissimum* L.) в зависимости от периода селекции / В.А. Лемеш [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. – Минск, 2013. – Т. 15. – С. 75–86.

34. Urbanovich, O.Y. Identification of apple tree cultivars growing in Belarus using SSR-markers / O.Y. Urbanovich, Z.A. Kazlovskaya // Acta Hort. (ISHS). – 2009. – Vol. 839. – P. 479–486.

35. Polymorphism of SSR Alleles in Pear Cultivars Grown in Belarus / O.Yu. Urbanovich [et al.] // Russian Journal of Genetics. – 2011. – Vol. 47, № 3. – P. 349–358.

36. Identification of apple sport mutants of ‘Antonovka’ by molecular methods / O.Yu. Urbanovich [et al.] // Acta Horticulturae. – 2013. – Vol. 979. – P. 299–303.

37. Микросателлитное маркирование родительских линий и гибридов подсолнечника (*Helianthus annuus*) белорусской селекции с целью идентификации генотипов / О.П. Шатарнов [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2012. – № 3. – С. 55–60.
38. Шимкевич, А.М. Идентификация, культивируемых в Беларуси сортов ячменя с применением SSR анализа / А.М. Шимкевич, Н.В. Луханина, О.Г. Давыденко. // Материалы конференции «Современные методы использования генетических ресурсов в селекции ячменя и овса» г. Санкт-Петербург, 1–5 июля 2013 года в Сборнике «Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции; генетические ресурсы овса, ржи, ячменя». – Санкт-Петербург; ГНУ ВИР им. Вавилова. – 2013. – Т. 171. – С. 15–17.
39. Идентификация простых гибридов и определение типичности инбредных линий кукурузы на основе полиморфизма микросателлитной ДНК / Е.В. Гузенко [и др.] // Доклады НАН Беларуси. – 2010. – Т. 54, № 4. – С. 92–96.
40. ДНК-диагностика врожденных иммунных дефицитов крупного рогатого скота, обусловленных генными мутациями / В.А. Машеро [и др.] // Экология и животный мир: международный научно-практический журнал. – 2008. – № 2. – С. 43–49
41. Распространение вируса лейкоза крупного рогатого скота у коров чернопестрой породы с различным уровнем молочной продуктивности / Н.А. Зиновьева [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2012. – № 6. – С. 49–55.
42. Михайлова, М.Е. Влияние полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада *bGH*, *bGHR*, *bIGF-1* на признаки молочной продуктивности у крупного рогатого скота голштинской породы / М.Е. Михайлова, Е.В. Белая // Докл. НАН Беларуси. – 2011. – Т. 55, № 2. – С. 63–69.
43. Михайлова, М.Е. Полиморфные варианты генов соматотропинового каскада *bPit-1*, *bPrl* для ДНК-типирования признаков молочной продуктивности крупного рогатого скота голштинской породы / М.Е. Михайлова, Е.В. Белая // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2011. – № 2. – С. 49–53.
44. Михайлова, М.Е. Выявление предпочтительных генотипов свиней по гену *ESR F18/FUT1* по устойчивости к возбудителям колибактериоза и ДНК-диагностика вируса, вызывающего репродуктивно-респираторный синдром свиней / М.Е. Михайлова, А.И. Киреева, Н.В. Камыш // Таврійський науковий вісник: Науковий журнал. – Вип. 76, Ч. 2. – Херсон: Гринь Д.С., 2011. – С. 368–379.
45. Михайлова, М.Е. Оценка полиморфизма *ESR1-PVUIII* гена эстрогенового рецептора у свиней с использованием метода ПЦР-ПДРФ и технологии HRM-анализа / М.Е. Михайлова, Е.Л. Романишко // Доклады НАН Беларуси. – 2014. – Т. 58. – С. 91–95.
46. Михайлова, М.Е. Полиморфизм генов соматотропиновой оси (*pGH*, *pIGF-2*, *pIGF-1*, *pIGF-1R*) у свиньи домашней (*Sus Scrofa domestica*) / М.Е. Михайлова, Е.Л. Романишко // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. – Минск, 2013. – Т. 14 – С. 69–77.
47. Методические рекомендации по проведению генетической экспертизы крупного рогатого скота с помощью микросателлитного анализа / М.Е. Михайлова [и др.]. Минск: Право и экономика, 2011. – 36 с.
48. Исаенко, Е.В. Генетическая модификация картофеля: достижения и перспективы / Е.В. Исаенко, А.В. Шахбазов, Н.А. Картель // Весці Нац. Акад. навук Беларусі, Сер. Біял. Навук. – 2007. – № 3. – С. 110–115.
49. Родькина, И.А. Особенности экспрессии целевого признака устойчивости к УВК в генеративном поколении трансгенного картофеля / И.А. Родькина, Г.А. Яковлева // Картофелеводство: сборник научных трудов. – Минск, 2008. – Вып. 14. – С. 102–114.
50. Трансгенные растения картофеля белорусских сортов, экспрессирующие гены антимикробных пептидов цекропин-мелиттинового типа / Н.Л. Вутто [и др.] // Генетика. – 2010. – Т. 46. № 9. – С. 1–9.
51. Оптимизация условий селективного отбора после генетической трансформации клюквы крупноплодной / В.Н. Решетников [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. – Минск, 2006. – Т. 3. – С. 101–104.
52. Савчин, Д.В. Генетическая трансформация растений векторными конструкциями с геном *gox Penicillium funiculosum* /

- Д.В. Савчин, А.С. Панюш, Н.А. Картель // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. – Минск: Право и экономика, 2011. – Т. 12. – С. 49–55.
53. Получение трансгенных растений ярового рапса (*Brassic napus* var. *L. olerifera* DC), экспрессирующих кДНК *CYP11A1* цитохрома P450 сс животного происхождения / А.М. Шишлова-Соколовская [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. бiял. навук. – 2011. – № 1. – С. 27–33.
54. Антипова, Т.В. Опосредованная *Agrobacterium tumefaciens* транзientная экспрессия *uidA* гена в эксплантах брусники обыкновенной / Т.В. Антипова, В.Л. Филипеня, В.Н. Решетников // Сборник трудов Международной конференции «Теоретические основы применения биотехнологии, генетики и физиологии растений в современной селекции растений и растениеводстве», Брянск – Минск – Люблин, 2009. – С. 3–7.
55. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Hyacinthus orientalis* with thaumatin II gene to control fungal diseases / Е.А. Popowich [et al.] // Plant Cell Tiss. Organ Cult. – 2007. – Vol. 90. – P. 237–244.
56. Полиморфизм генов ренин-ангиотензиновой системы в шести этногеографических регионах Беларуси / Л.Н. Сивицкая [и др.] // Генетика. – 2008. – Т. 44, № 5. – С. 702–706.
57. Полиморфные варианты генов системы тромбообразования и их роль в развитии инфаркта миокарда / А.Л. Гончар [и др.] // Артериальная гипертензия. – 2009. – Т. 15, № 4. – С. 466–469.
58. Risk factors of renal amyloidosis in patients with rheumatoid arthritis / N.F. Soroka [et al.] // International Journal of Biomedicine. – 2010. – Vol. 1, № 1. – P. 14–23.
59. Molecular-genetic analysis of genetic predisposition to myocardial infarction and comparison of risk factor population rates in different countries / M. Gonchar [et al.] // Radiobiology and Environmental Security. – Springer, 2011. – P. 111–126.
60. Роль полиморфизма гена 1 (альфа)-цепи коллагена I типа и гена рецептора витамина D в развитии остеопенического синдрома у женщин перименопаузального возраста с патологией щитовидной железы / Е.А. Аксенова [и др.] // Медицинская панорама. – 2011. – № 7. – С. 69–72.
61. Association of *VDR BsmI* gene polymorphism, bone turnover markers and bone mineral density in severe postmenopausal osteoporosis / M. Tamulaitienė [et al.] // Gerontologija. – 2012. – № 13 (4). – P. 206–213.
62. Association Between Polymorphisms of *VDR*, *COL1A1*, and *LCT* Genes and Bone Mineral Density in Belarusian Women With Severe Postmenopausal Osteoporosis / P. Marozik [et al.] // Medicina (Kaunas). – 2013. – № 49 (4). – P. 177–184.
63. Генетические факторы риска развития метаболического синдрома / М.Д. Амелянович [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. – Минск, 2013. – Т. 16. – С. 24–31.
64. Гончар, А.Л. Роль генетических факторов в развитии инфаркта миокарда (гендерные и возрастные аспекты) / А.Л. Гончар, И.Б. Мосса // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. – Минск, 2013. – Т. 15. – С. 7–15.
65. Функция внешнего дыхания у пациентов с бронхиальной астмой с учетом генетического полиморфизма / Н.И. Дударева [и др.] // Здравоохранение. – 2013. – № 6. – С. 4–6.
66. Сивицкая, Л.Н. Основные мутации гена наследственного гемохроматоза (*HFE*) у белорусов / Л.Н. Сивицкая, Н.Г. Даниленко, О.Г. Давыденко // ARS Медика. – 2009. – Т. 16, № 6. – С. 138–145.
67. Богуш, Л.С. Роль C282Y и H63D мутаций *HFE* гена в формировании перегрузки железом у больных при патологическом состоянии печени (оригинальное исследование) / Л.С. Богуш, Л.Н. Сивицкая, Н.Г. Даниленко // ARS Медика. – 2009. – Т. 16, № 6. – С. 97–105.
68. *HFE* gene mutation associated with the severity of gestational diabetes mellitus in Belarusian women / L. Sivitskaya [et al.] // Open Journal of Endocrine and Metabolic Diseases. – 2013. – Vol. 3, № 1. – P. 13–17.
69. Иванова, В.Ф. Семейно-наследственная атрофия зрительных нервов Лебера / В.Ф. Иванова, Н.Г. Даниленко, А.А. Суковатых // Офтальмология в Беларуси – 2011. – № 3 (10). – С. 48–54.
70. Семейный случай митохондриальной энцефаломиопатии с лактат-ацидозом и инсультоподобными эпизодами (MELAS) / С.А. Лихачев [и др.] // Неврология и нейрохирургия. Восточная Европа. – 2013. – № 1 (17). – С. 16–27.

71. Синдромы митохондриальной деплеции: клинические особенности и ДНК-диагностика / Н.Г. Даниленко [и др.] // Неврология и нейрохирургия. Восточная Европа. – 2013. – № 3 (19). – С. 97–111.
72. Clinical peculiarities of the non-syndromic sensorineural hearing loss in children of Belarus / A. Levajia-Smaliak [et al.] // Journal of Hearing Science. – 2011. – Vol. 1, № 2. – P. 57–59.
73. Spectrum of genetic changes in patients with non-syndromic hearing impairment and extremely high carrier frequency of *35delG GJB2* mutation in Belarus / N. Danilenko [et al.] // PLoS One – 2012. – Vol. 7 (5) – e36354.
74. When should one look for IVS1 +1 A>G splice mutation in patients with nonsyndromic sensorineural hearing loss? / O. Olejnik [et al.] // Journal of Hearing Science. – 2014. – № 4 (2): OA24-29.
75. Генетические факторы предрасположенности к алкоголизму / И.М. Голоенко [и др.] // Здравоохранение. – 2010. – № 8. – С. 25–29.
76. Копытов, А.В. Значение полиморфизма гена переносчика серотонина 5-HTTLPR в формировании синдрома алкогольной зависимости у мужчин в белорусской популяции / А.В. Копытов, В.Г. Обьедков, И.М. Голоенко // Здравоохранение. – 2012. – № 7. – С. 67–72.
77. Связь первичного патологического влечения к алкоголю с генетическими факторами риска развития алкогольной зависимости у подростков и молодых людей мужского пола / А.В. Копытов [и др.] // Медицинский журнал. – 2012. – № 3. – С. 22–27.
78. Полиморфизм гена рецептора лептина и изменения показателей лептинемии у детей с экзогенно-конституциональным ожирением / А.В. Солнцева [и др.] // Весці Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2011. – № 1. – С. 69–76.
79. Гендерные различия и генетический полиморфизм адипонектина у детей с алиментарным ожирением / А.В. Солнцева [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2011. – № 2. – С. 29–37.
80. Солнцева, А.В. Генетические аспекты в понимании феномена компульсивного переживания у детей с ожирением / А.В. Солнцева, Т.А. Емельянцева, Е.А. Аксенова // Медицинские новости. – 2013. – № 10 (229). – С. 31–33.
81. Роль полиморфизма генов симпатoadреналовой системы в формировании фенотипических признаков гипертрофической кардиомиопатии / С.С. Ниязова [и др.] // Новости медико-биологических наук. – 2013. – Т. 8, № 3. – С. 23–28.
82. Мутации в генах *MYH7*, *MYBPC3* у пациентов с гипертрофической кардиомиопатией, проживающих в Республике Беларусь / С.С. Ниязова [и др.] // Молекулярная медицина. – 2014. – № 3. – С. 45–50.
83. LMNA-related dilated cardiomyopathy / T. Vaikhanskaya [et al.] // Oxford Medical Case Reports 2014. – 2014 (6): 102-104 doi: 10.1093/omcr/omu040.
84. Риск развития шизофрении в контексте полиморфизма гена катехол-О-метилтрансферазы / М.М. Скугаревская [и др.] // Психическое здоровье. – 2013. – № 5 (84). – С. 23–29.
85. Assessment of the Relationship between Combinations of Polymorphic Variants of Xenobiotic Metabolizing Enzyme Genes and Predisposition to Lung Cancer / E.P. Mikhalenko [et al.] // Cytology and Genetics. – 2014. – Vol. 48, № 2. – P. 111–116.
86. Полиморфизм генов эксцизионной репарации *XPB*, *XRCC1* и *hOGG1* у населения Республики Беларусь и его влияние на канцерогенез / О.П. Романюк [и др.] // Экологическая генетика. – 2013. – Т. 11, № 4. – С. 45–63.
87. Мутационный статус гена *FGFR3* в проспективной когорте пациентов, страдающих раком мочевого пузыря / М.П. Смаль [и др.] // Доклады НАН Беларуси. – 2013. – Т. 57, № 1. – С. 96–101.
88. Polymorphism of DNA repair genes *OGG1*, *XRCC1*, *XPB*, and *ERCC6* in bladder cancer in Belarus / V.P. Ramaniuk [et al.] // Biomarkers. – 2014. – № 19 (6). – P. 509–516.
89. Влияние полиморфизма генов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы на выраженность клинических признаков гипертрофической кардиомиопатии / С.С. Ниязова [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. – Минск, 2013. – Т. 16. – С. 16–23.
90. Анализ молекулярно-генетических маркеров, ответственных за устойчивость к физическим нагрузкам, у представителей

академической гребли / Л.А. Кундас [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. – Минск, 2013. – Т. 14. – С. 101–106.

91. Система генетического тестирования спортсменов по устойчивости к гипоксии / И.Б. Моссэ [и др.] // Консилиум. – 2013. – № 3. – С. 17–18.

92. Сравнение генотипов спортсменов разной специализации по комплексу генов спортивной успешности / И.Б. Моссэ [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. – Минск: Право и экономика, 2012. – Т. 13. – С. 19–24.

93. Михайлова, М.Е. Генетическое разнообразие белорусской популяции европейского зубра / М.Е. Михайлова, Ю.В. Медведева, А.И. Буневич // Наука и инновации. – 2011. – № 5 (99). – С. 50–53.

94. Михайлова, М.Е. Сравнение аллельных частот микросателлитных локусов белорусской и польской популяций европейского зубра (*Bison bonasus*) / М.Е. Михайлова, Ю.В. Медведева // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2013. – № 2. – С. 47–52.

95. Оценка генетической структуры популяций больших белоголовых чаек: серебристой (*Larus argentatus*) и хохотуньи (*Larus cachinnans*), обитающих в Беларуси, с помощью полиморфных ДНК-маркеров / М.Е. Михайлова [и др.] // Материалы IV Международной научно-практической конференции «Современные экологические проблемы устойчивого развития полесского региона и сопредельных территорий: наука, образование, культура», г. Мозырь, 24–25 сентября 2009 г. / Мозырский гос. пед. ун-т им. И.П. Шамякина; под ред. В.В. Валетова. – Мозырь, 2009. – С. 53–55.

Дата поступления статьи 15 сентября 2014 г.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ЛЬНА

Обзорная статья

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»,
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН
Российская Федерация, г. Москва, ул. Вавилова, 32

Генетическая инженерия в растениеводстве

Первая публикация об экспрессии чужеродных генов в растительных клетках появилась в 1983 году в журнале «Nature» [1]. С тех пор более чем на 120 видах растений проведена успешная трансформация. Первые коммерческие сорта на основе трансгенных растений были зарегистрированы в 1994 году американской фирмой Монсанто. Это картофель, устойчивый к колорадскому жуку (New Leaf); хлопчатник, устойчивый к насекомым и вирусным болезням (Bollgard); кукуруза, толерантная к гербициду глифосату и кукурузной мухе (Yield Gard) и др. [2].

За прошедший период генетически модифицированные (ГМ) коммерческие сорта показали высокую эффективность и преимущество перед сортами, созданными с помощью традиционной селекции, поэтому посевные площади под ними стремительно расширяются. По данным Международной службы по мониторингу за применением агротехнологий (ISAAA), посевы ГМ культур увеличились более чем в 100 раз с 1,7 млн га в 1996 г. до 175,2 млн га в 2013 г. ГМ культуры выращивают в 27 развитых и развивающихся странах, лидерами среди которых являются США, Бразилия, Аргентина, Индия и Канада. На территории Евросоюза в 2013 г. биотехнологические культуры выращивали в Испании, Португалии, Чехии, Румынии и Словакии.

Генетически измененные растения с устойчивостью к различным классам гербицидов остаются наиболее успешным биотехнологическим продуктом. По данным ФАО, в мире зарегистрировано 192 трансгенные формы различных видов растений, толерантных к гербицидам, что составляет 52% от общего количества ГМ растений [3]. Компания Dow

AgroSciences (США) заявила о выпуске на рынок ГМ сортов сои и кукурузы с одновременной устойчивостью к глифосату и 2,4-D. В случае одобрения государственными структурами США эти культуры будут представлять начало второго поколения ГМ сельскохозяйственных культур [4].

Накопленные знания о механизмах патогенеза и современные возможности генетической инженерии позволяют создавать ГМ растения, устойчивые к насекомым-вредителям, грибным, бактериальным и вирусным инфекциям [5–9]. По последним данным, 172 трансгенные формы различных видов растений с устойчивостью к насекомым прошли или проходят процедуру оценки биобезопасности [3]. В 2011 году появилась работа, в которой приводятся данные о создании трансформантов, устойчивых к болезням, вызываемых виридами. Получены трансгенные растения картофеля, экспрессирующие ген рибозима hammerhead, транскрипты которого расщепляют минус цепь РНК веретеновидного вириода клубней картофеля [10]. Двадцать одна зарегистрированная форма относится к категории ГМ растений с улучшенными признаками, связанными с урожайностью и качеством продукции растениеводства, а также с синтезом вторичных метаболитов, включая вещества для медицины [3, 11, 12, 13].

В последние годы большое значение приобретают работы по созданию растений, устойчивых к неблагоприятным факторам среды: холод, засуха, засоление почвы, повышенное содержание тяжелых металлов и др. [14, 15, 16].

Международная служба мониторинга за применением агротехнологий составила рейтинг посевов биотехнологических культур, согласно которому соя, кукуруза, хлоп-

чатник, рапс занимают лидирующие позиции. В 2013 г. на мировой рынок вышли ГМ-сорта люцерны, сахарной свеклы, папайи, тыквы, тополя, томатов и перца [17]. В мире существует единственная коммерческая ГМ линия льна масличного CDC Triffid на основе сорта Norlin, устойчивая к гербициду сульфонилмочевине [18].

Генетическая трансформация льна масличного

Первое сообщение о возможности проведения генетической трансформации льна с помощью *A. tumefaciens* появилось в 1983 году. Herburn et al. в эксперименте наблюдали развитие галла на эксплантах льна после инфицирования агробактериями [19]. В 1987 году Basiran et al. опубликовали работу с описанием регенерации трансформированных побегов через стадию каллусогенеза [20]. Генетическая трансформация льна была осуществлена при использовании разоруженных векторов *A. tumefaciens*, которые включали ген *iptIII* и дикий тип гена, синтезирующего нопалин. В дальнейшем Zhan et al. описали регенерацию побегов льна, трансформированных с помощью *Agrobacterium rizogenes* [21]. Семядоли, использованные в качестве эксплантов для трансформации, формировали трансформированные корни, которые впоследствии регенерировали модифицированные побеги. Подтвержденная агробактериальная трансформация льна и последующее создание генетически модифицированных растений с устойчивостью к глифосату представлена в работе М. Jordan и А. McHughen [22]. Глифосатустойчивые растения были получены в результате встройки гена 5-энолпирувиллициклат-3-фосфат синтазы (EPSPS) при трансформации гипокотильных эксплантов льна. В этом же исследовании впервые сообщалось об обнаружении так называемых «ложных трансформантов» (в англ. лит. – “escapes”) – растений, приспособившихся к существованию на селективной среде с антибиотиком или гербицидом, но не содержащих в своем геноме чужеродной ДНК.

Получены трансгенные растения льна с устойчивостью к гербициду хлорсульфону [23]. Известна попытка ввести ген фосфотрицин-N-ацетилтрансферазы (*pat*),

придающий устойчивость к неселективному гербициду глюфосинату, однако полевые испытания растений-трансформантов льна не были успешны [24].

Дальнейшие работы в области создания генетически модифицированных растений льна были направлены на повышение эффективности технологии, предложенной М. Jordan и А. McHughen. Проводились исследования периода сокультивации растительных эксплантов и агробактерий, периода прекультивации, рассматривались вопросы наследования признаков потомками генетически модифицированных растений, а также причины появления химерных растений-регенерантов [25–30]. F. Lamblin с соавт. представили ген фосфоманнозной изомеразы (*pmi*) в качестве альтернативного селективного маркера генам устойчивости к антибиотикам в экспериментах по получению трансгенных растений льна [31]. M. Wrobel-Kwiatkowska с соавт. предприняли попытку улучшить устойчивость льна к *Fusarium oxysporum* и *Fusarium culmorum* путем введения гена β -1,3-глюканазы из картофеля. Полученные трансгенные растения оказались в три раза устойчивее к фузариозному увяданию, чем немодифицированные формы [32].

В качестве альтернативного способа прямой трансформации был предложен метод биобаллистики [33, 34]. Метод биобаллистики считается одним из перспективных способов введения чужеродной ДНК. Он пригоден для трансформации любых растительных объектов, тканей и органов; не нуждается в сложных векторных конструкциях; возможна прямая регенерация трансгенных побегов минуя каллус; возможно введение нескольких генов одновременно. Метод биобаллистики был адаптирован для изучения транзientной экспрессии различных специфических промоторов. Н. Drexler с соавт. проводили поиск сильного растительного промотора, способного обеспечить высокую экспрессию целевого гена в семенах льна. Авторами показано, что промотор гена *usp* (кодирующий белок семян *Vicia faba* L.) и промотор гена *leb4* (кодирующий запасующий белок легумин семян *Vicia faba* L.) могут быть успешно использованы для экспрессии гетерологичных генов в семенах льна при получении трансгенных растений [35].

Генетическая трансформация льна-долгунца

Проводятся эксперименты по использованию агробактериальной, РЕГ-индуцированной и биобаллистической трансформации для создания модифицированных растений льна-долгунца. В результате применения этих методов на гипокотильных эксплантах льна-долгунца удалось регенерировать трансгенный каллус, устойчивый к канамицину [36]; создать первичные растения-трансформанты, несущие химерные или антисмысловые встройки [37, 38]; растения льна-долгунца, устойчивые к гербицидам группы хлорсульфурина [39]. Получены первичные растения-трансформанты дикорастущих видов льна, содержащие маркерные гены *nptII*, *gus* [40].

S. Rakousky с соавт. предложили использовать ген устойчивости к гиромоцину В качестве альтернативного селективного маркерного гена, что значительно снизило образование нетрансформированных побегов льна-долгунца [41]. М. Белоговой разработан метод трансформации семядольных эксплантов льна-долгунца, и получены растения с репортерным геном β -глюкуронидазы (*gus*). Установлено, что наличие в используемой для трансформации конструкции последовательности внутренней инициации трансляции IresMPCr75, выделенной из генома тобамовируса крестоцветных, вызвало увеличение эффективности трансляции по сравнению с экспрессией гена в линиях трансгенных растений, полученных после трансформации с конструкциями, не имеющими такой последовательности [42]. М. Wrobel-Kwiatkowska с соавт. начали работы по улучшению качества льноволокна. С помощью технологии РНК-интерференции было увеличено содержание предшественника лигнина и сокращено содержание пектина и гемицеллюлозы у трансгенных растений льна-долгунца, что может положительно сказаться при экстракции волокна. В этом же исследовании отмечено, что полученные трансгенные растения были в два раза чувствительнее к *Fusarium oxysporum*. Грибы, принадлежащие к данному роду, используются при мочке льна, поэтому предполагается, что данный процесс будет проходить намного эффективнее на растениях льна-долгунца с повышенной восприимчивостью [43]. Этими же исследователями созданы трансгенные растения льна-долгунца, в геном которых включены три бактериальных

гена *phbA*, *phbB*, *phbC*, кодирующих ключевые ферменты биосинтеза полигидроксиалканоатов. Успешная экспрессия данных генов способствовала накоплению в стебле трансгенных растений льна-долгунца такого соединения как полигидроксibuтират, которое значительно улучшило упругие свойства волокна. В то же время у модифицированных растений отмечено сокращение содержания лигнина, пектина и гемицеллюлозы, а также значительное увеличение уровня фенольных кислот, при этом снижения урожайности не обнаружено [44].

М. Beranova с соавт. предложили использовать ультразвуковую обработку гипокотильных и семядольных эксплантов льна-долгунца перед проведением агробактериальной трансформации. Электронная микроскопия показала, что после воздействия ультразвука на поверхности растительного экспланта остаются микропоры, что, по мнению исследователей, облегчает проникновение чужеродной ДНК. Транзиентная экспрессия гена *gfp* в клетках трансформированного каллуса наблюдалась в течение 30 дней [45]. J. Vleho с соавт. проверяли возможность применения метода агробактериальной инфильтрации листьев для создания трансгенных растений льна-долгунца. В течение 6–7 дней после инфильтрации они наблюдали транзиентную экспрессию репортерного гена *gfp* в эндоплазматическом ретикулуле клеток листа [46].

Генетическая трансформация льна-долгунца химерным геном *gfp-tuab*

Несмотря на определенные успехи в области генетической трансформации льна, получение стабильно воспроизводимых трансгенных линий до сих пор остается трудноразрешимой задачей, что делает особенно актуальным изучение особенностей создания, развития и репродукции ГМ линий данной сельскохозяйственной культуры.

Эффективность генетической трансформации чужеродными генами в значительной степени зависит от выбранного генотипа, который определяет частоту образования морфогенного каллуса, эффективность регенерации проростков, выживаемость растительной ткани после воздействия селективных сред. Для льна-долгунца характерны значительные генотипические различия по регенерационной

способности [47, 48]. В наших исследованиях эксперименты по генетической трансформации проводились на сортах льна-долгунца белорусской селекции Белита и Василек, для которых выбранные условия культивирования являются оптимальными для реализации их морфогенетического потенциала [49]. Для агротрансформации мы использовали сегменты гипокотилей пятидневных проростков льна-долгунца длиной 3–5 мм, которые помещали на агаризованную среду МС-БН и предкультивировали в течение 48 ч. Наши наблюдения показали, что данный этап является обязательным при проведении агробактериальной трансформации льна-долгунца. В противном случае количество выживших эксплантов после трансформации резко снижается, а в некоторых экспериментах погибают все экспланты.

Отбор первичных трансформантов был основан на толерантности модифицированных клеток и тканей к канамицину, поскольку встраиваемая плазида несла маркерный ген *nptII*.

Для проведения генетической трансформации использована конструкция с геном тубулина, «слитым» с репортерным геном *gfp* [50, 51, 52]. Анализ новообразований с помощью конфокального микроскопа подтвердил инкорпорацию GFP-меченого тубулина в клетки каллуса, сформировавшегося на гипокотильных эксплантах. Встроенный химерный ген *gfp-tuab* экспрессировался не только в клетках модифицированного каллуса, но и в побегах, сформировавшихся на каллусах. После трех месяцев культивирования на селективной среде выжило 23 первичных растения-трансформанта льна-долгунца, ДНК которых была исследована с помощью молекулярно-генетического анализа. Встройка маркерного гена *nptII* и 35S промотора обнаружена у 17-ти растений-трансформантов, последовательность только 35S промотора найдена у 4-х растений-трансформантов. По некоторым данным, генетическая конструкция может встраиваться в ядерный геном растений в виде фрагментов [53] и только с помощью секвенирования возможно установить полноценность встройки.

С применением биобаллистической трансформации гипокотильных эксплантов льна-долгунца сорта Василек получены транс-

генные растения, несущие генетическую конструкцию с химерным геном *gfp-tuab*. Трансгенный статус первичных трансформантов подтвержден с использованием конфокальной микроскопии. Методом ПЦР-анализа доказана достоверность встройки последовательности 35S промотора и селективного маркерного гена *nptII* у семи из десяти растений [54].

Характеристика трансгенных линий льна

Жизнеспособные трансгенные растения послужили основой для создания самоопыленных линий: В-1 (агробактериальная трансформация сорта Белита), V-1, V-2, V-3 (биобаллистическая трансформация сорта Василек). Все линии воспроизводились в теплице в течение трех генераций, и в каждом поколении проводился отбор истинных растений-трансформантов с помощью ПЦР-анализа. Следует отметить, что трансгенные линии достоверно не отличались друг от друга и от исходных сортов по продолжительности фенологических стадий и высоте растений, тогда как количество коробочек и количество семян в коробочке снизилось уже в первый год воспроизведения [55]. Аномалии в развитии цветков, пыльников, зародыша и эндосперма, приводящие к снижению репродуктивной функции, выявлены и у других видов трансгенных растений, например, табака и томата. При этом наблюдаются нарушения как в процессе мейотического деления клеток, так и в микроспорогенезе [56, 57, 58]. С целью выяснения причин снижения семенной продуктивности трансгенных линий было проведено изучение мейоза этих линий на стадиях метафазы I и анафазы I.

Сравнительное изучение мейоза выявило, что при его нормальном течении у изучаемых линий наблюдалось 15 бивалентов в основном открытых. Встречались клетки, содержащие униваленты в метафазе I. Наличие открытых бивалентов не нарушает общего течения мейоза, но может указывать на ослабление конъюгации. Отсутствие конъюгации хромосом является причиной нарушений при прохождении последующих стадий мейоза. В норме центромерные районы объединенных в биваленты хромосом ориентированы к полюсам веретена деления. Полярная

ориентация унивалентных хромосом в клетках исследуемых линий нарушена – чаще всего они находятся за пределами метафазной пластинки, сбоку от нее или у полюсов микроспороцита. Клетки с нарушениями (клетки с унивалентами и т.д.) составили у контроля: сорт Василек – 2,19% и сорт Белита – 1,98%, что не является критическим. У трансгенных линий процент клеток с нарушениями составил: V-2 – 3,84% и V-3 – 5,67%; B-1 – 3,01%. В исследованном материале встречались клетки как с тривалентами, так и с квадрилентами. Основной тип нарушения у линий в анафазе I и анафазе II состоит в отстаивании нескольких хромосом от основной группы деления и образовании мостов. Большинство отстающих хромосом не достигает полюсов и остается в цитоплазме. Когда наступает телофаза, они становятся микроядрами в клетках диад. Были выявлены клетки с дегенерацией хромосом. В результате подобных нарушений формируются гаметы с несбалансированным числом хромосом, что приводит к снижению фертильности пыльцы и обуславливает нарушение репродуктивной функции. По-видимому, встраивание в геном трансформантов льна-долгунца генетической конструкции методами как биобаллистической, так и агробактериальной трансформации не имеет специфичности и может приводить к различным структурным изменениям хромосом. Эти изменения незначительно отражаются на морфологии растений трансгенных линий, но в разной степени нарушают течение мейоза, что приводит к различной динамике снижения числа завязавшихся семян. Наше исследование показало, что фактором нестабильности репродукции трансгенных линий льна-долгунца, возможно, является нарушение мейоза, вызванное встройкой чужеродной генетической конструкции, что может приводить к прекращению воспроизводства созданных трансгенных линий.

Растения «ложные трансформанты»

Последствия воздействия генетической трансформации могут рассматриваться как сложный, многоуровневый биотический стресс. Особенность проявления стресса заключается в том, что растение, будучи лишенным пространственной подвижности, необходимой для поиска лучшего места обитания, компенсирует это повышенной геномной и фи-

зиологической «подвижностью», «пластичностью», позволяющей гибко приспосабливаться к стрессовым факторам различной природы [59]. В ответ на любой вид стресса у растения происходит активация окислительных ферментов, что может стать причиной целого спектра изменений в ДНК – от точечных мутаций до таких крупных изменений, как абберрации и полиплоидия [60]. Одним из побочных эффектов трансгенеза является появление растений, так называемых «ложных трансформантов» (в англ. лит. – “escapes”), приспособившихся к существованию на селективной среде, но не содержащих в своем геноме чужеродной ДНК. Такие растения являются уникальными, расширяют спектр генетической изменчивости и могут быть полезны для создания форм с ценным сочетанием признаков [61].

Молекулярно-генетический анализ первичных трансформантов льна-долгунца выявил пять растений, которые не несли трансгенной вставки, но росли на селективной среде. Четыре из них успешно адаптировались к условиям *ex vitro* и выращивались в контролируемых условиях климатической камеры. Наблюдения за онтогенезом данных растений показали, что фенологические стадии роста (елочка, быстрый рост, бутонизация, цветение, спелость) были намного продолжительней, чем у исходных сортов. Так, стадия бутонизации наступила только после 180 дней роста, тогда как весь вегетационный период у исходных сортов максимально составляет 105 дней. В результате самоопыления растений «ложных трансформантов» были получены семена, которые разделили на группы: для испытания в естественных условиях, для испытания в условиях *in vitro*.

Регенерационная способность гипокотильных эксплантов «ложных трансформантов» была в 3–4 раза ниже, чем у эксплантов контрольных сортов. Кроме того, у растений «ложных трансформантов» обнаружено довольно редкое для льна явление – полиэмбриония семян. Анализ метафазных пластинок корневых чехликов установил, что одна пара близнецов «ложных трансформантов» составляла сочетание гаплоидного и диплоидного растения, другая – двух гаплоидных растений.

До настоящего времени не проводились исследования, связанные с изучением «ложных трансформантов», появление которых, по на-

шему мнению, можно рассматривать как естественный соматический мутагенез, усиленный культивированием организма в стрессовых условиях (генетическая трансформация). Для дальнейшего исследования растений «ложных трансформантов» нами были созданы самоопыленные линии на их основе: EsV-1, EsV-2, EsV-3, EsB-1, которые воспроизводились в полевых условиях в течение двух вегетационных периодов.

Сравнительный анализ морфологических признаков первого года воспроизводства линий «ложных трансформантов» показал достоверное превышение линиями EsV-3, EsB-1 уровня контрольных сортов (исходных сортов Василек, Белита) по признакам «общая высота растения» и «техническая длина»; линией EsV-3 – по признаку «количество коробочек». При сравнении вариации морфологических признаков оказалось, что контрольные сорта более однородны, чем линии «ложных трансформантов» первого года воспроизводства [61]. В исследованиях А. Полякова отмечено, что популяции растений-регенерантов первого поколения по высоте и технической длине стебля находятся на уровне исходного сорта или выше, а по числу коробочек и семян на уровне или ниже контроля [62]. В других работах показано, что в большинстве случаев происходит снижение средних значений по количественным признакам, но возможно появление форм с положительными свойствами [63, 64].

Первичная оценка морфоанатомических показателей линий «ложных трансформантов» показала, что в стеблях растений формируются волокна граненой формы с небольшим внутренним просветом и в большом количестве в одном лубяном пучке, кроме того, растения линии EsV-2, EsV-3 достоверно превзошли уровень контрольного сорта Василек по числу элементарных волокон на срезе на 12,2%, что характерно для перспективных по качеству волокна форм льна-долгунца [61].

Результаты второго года полевых испытаний «ложных трансформантов» обнаружили, что изменчивость признака «общая высота растения» у линий EsV-1, EsV-3, EsB-1 достоверно ниже, чем у контрольных сортов. Следует отметить, что для линии EsB-1 характерна меньшая изменчивость и по всем остальным признакам, что свидетельствует о сбалансированности сформировавшегося генотипа.

Соматональные изменения могут иметь как наследственную генетическую природу, так и являться длительными модификациями. Применение молекулярных методов на разных этапах культивирования клеток дает возможность отслеживать генетическую изменчивость и делать предположения о времени и природе возникновения мутаций. С помощью RAPD- и ISSR-анализа были обнаружены изменения ДНК у соматоклонов гороха [63]. Недостаточно высокая разрешающая способность RAPD-метода при анализе полиморфизма близкородственных генотипов обусловила выбор нами микросателлитного анализа как высоковоспроизводимого, более точного и информативного.

Для выявления возможных изменений в геноме растений «ложных трансформантов» проведен SSR-анализ внутрелинейного и межлинейного ДНК- полиморфизма первого семенного поколения. Молекулярно-генетический анализ с помощью 10 информативных праймеров [65, 66] не обнаружил различий между индивидуальными растениями внутри линий «ложных трансформантов», что подтверждает генетическую однородность данных форм.

При сравнении микросателлитных профилей амплификации линий «ложных трансформантов» и контрольных сортов установлен полиморфизм по шести локусам Lu2, Lu13, Lu17, Lu21, Lu23, Lu28, при этом обнаружены отличия аллельного состава как между линиями, так и между линиями и контрольными сортами [61]. Подавляющая доля мутаций в микросателлитных локусах возникает за счет специфической ошибки репликации ДНК в районе микросателлита – проскальзывания (англ. slippage), что приводит к появлению аллеля нового размера. В то же время часть микросателлитных мутаций может изменять количество повторов как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения (на два и более повторов). Мутационные изменения, затрагивающие размеры микросателлитных кластеров и число микросателлитных звеньев, изменяют такие важные молекулярно-биологические и биохимические характеристики как нуклеотидный состав, GC-содержание локусов, энергию Гиббса образования ДНК/ДНК-дуплекса, соотношение молекулярных масс 5'-3' и 3'-5' последовательностей.

Проведенный нами молекулярно-генетический анализ с помощью SSR-маркеров позволил впервые обнаружить изменения в геноме потомства растений «ложных трансформантов» льна-долгунца и выявить отличия по генетической структуре от исходных форм.

При адаптации к определенным стрессовым факторам окружающей среды в некоторых линиях льна-долгунца (генотрофы), а также сортах происходят наследуемые изменения генома, которые связаны с появлением вставки LIS-1 – последовательности нуклеотидов размером 5,7kb, которая встраивается в единичной копии в определенный сайт генома льна. В большинстве случаев появление LIS-1 специфически ограничивается особями (генотипами), реагирующими на ростовые условия, модифицируя свой геном в специфических условиях роста и, если условия не сохраняются, LIS-1 теряется. Однако встречаются генотипы, у которых вставка LIS-1 стабильно наследуется вне зависимости от условий и фенологических фаз развития [67]. Мы предположили, что стрессовые условия длительного культивирования *in vitro* при проведении генетической трансформации могли индуцировать перестройку и объединение последовательностей ДНК во вставку LIS-1 у растений «ложных трансформантов».

При анализе ДНК индивидуальных растений линии EsV-1 нами обнаружена вставка LIS-1. Получен положительный результат амплификации с праймерами к соответствующим концевым последовательностям LIS-1 у всех проанализированных индивидуальных растений линии EsV-1. При анализе ДНК линий EsV-2, EsV-3 и исходного сорта Василек вставки LIS-1 не обнаружено. Полученные данные подтверждают тот факт, что появление фрагмента ограничивается особями (генотипами), которые специфически реагируют на условия культивирования и модифицируют свой геном.

ПЦР-анализ ДНК линии EsB-1 дал положительный результат при амплификации с праймерами к последовательности LIS-1, при этом у исходного сорта Белита данный фрагмент не амплифицировался.

Возможно, что именно стрессовые условия культивирования *in vitro* при проведении генетической трансформации индуцировали появление вставки LIS-1 у растений «ложных трансформантов». При этом можно утверждать, что

исходные сорта Василек и Белита относятся к «пластичным» формам и в их геноме присутствуют короткие последовательности, из которых при определенных условиях собирается LIS-1. BLAST анализ генома сорта Bethune, который относится к «непластичным», не обнаружил соответствующие участки LIS-1, поэтому инсерция у данного сорта невозможна [68].

LIS-1 является первым подобным событием, описанным для сложных генетических систем, когда происходит специфическая воспроизводимая комплексная перестройка генома. Оригинальностью данного события является и то, что происходит оно в ответ на решение конкретных проблем роста и может быть стабильно передано потомству [67, 69]. Мы проанализировали два поколения линии EsB-1, выращенных в естественных условиях окружающей среды, и обнаружили стабильное наследование LIS-1. Безусловно, генотипы, имеющие вставку LIS-1, заслуживают особое внимание при дальнейших исследованиях механизмов адаптации льна к неблагоприятным факторам внешней среды. Кроме того, полагают, что гены, контролирующие ответ на стрессовое воздействие, тесно связаны с генами, контролирующими высокое качество льняного волокна, и наследуются сцепленно [70]. Современная селекция льна-долгунца ориентирована в основном на улучшение прядильных свойств льноволокна, и изучение генотипов, имеющих вставку LIS-1, представляет несомненный интерес.

Заключение

Изучение трансгенных линий льна-долгунца, экспрессирующих химерный ген *gfp-tua6*, созданных методами агробактериальной и биобаллистической трансформации, показало, что фактором нестабильности репродукции, возможно, является нарушение мейоза, вызванное встройкой чужеродного гена. Последствия генетической трансформации могут рассматриваться как сложный многоуровневый биотический стресс, который приводит к целому спектру изменений в ДНК трансформируемого растения. Впервые проведены молекулярно-генетические исследования растений «ложных трансформантов», которые обнаружили изменения в геноме. Появление и стабильное наследование вставки LIS-1 у линий «ложных трансформантов» заслуживает особого внимания при дальнейших исследованиях механизмов адаптации льна.

Список использованных источников

1. Expression of chimeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector / L. Herrera-Estrella [et al.] // *Nature*. – 1983. – Vol. 303, № 5915. – P. 209–213.
2. Статус коммерческих биотехнологических / ГМ культур в мире: 2010 г. // Клайв Джеймс ISAAA [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.isaaa.org>. – Дата доступа: 25.07.2011.
3. FAO GM Food Platform [Electronic resource] – Mode of access: <http://fao.org/gm-platform>. – Date of access: 30.07.2014.
4. Biosafety Information Centre [Electronic resource] – Mode of access: <http://www.biosafety-info.net>. – Date of access: 30.07.14.
5. Enhanced resistance to blast (*Magnaporthe grisea*) in transgenic japonica rice by constitutive expression of rice chitinase Revue / Y. Nishizawa [et al.] // *Theor. And Appl. Genetics*. – 1999. – Vol. 99, № 3–4. – P. 383–390.
6. Альфа-дефензины – антимикробные пептиды нейтрофилов: свойства и функции / А.С. Будихина [и др.] // *Иммунология*. – 2008. – Т. 29, № 5. – С. 317–320.
7. Expression of the bacterial gene *CspD* in tobacco plants increases their resistance to fungal and viral pathogens / К.А. Кромина [et al.] // *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.* – 2006. – Part 3. – P. 100–104.
8. Растение как объект биотехнологии / А.В. Бабилова [и др.] // *Комаровские чтения*. – 2007. – Вып. LV. – С. 184–212.
9. Viral Protection in Transgenic Tobacco Plants Expressing the Cucumber Mosaic Virus Coat Protein or its Antisense RNA / M. Cuzzo [et al.] // *Nature Biotechnology*. – 1988. – Vol. 6, № 5. – P. 549–557.
10. Trans-cleaving hammerhead ribozymes with tertiary stabilizing motifs: *in vitro* and *in vivo* activity against a structured viroid RNA / A. Carbonell [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2011. – Vol. 39, № 6. – P. 2432–2444.
11. High lysine and high tryptophan transgenic maize resulting from the reduction of both 19- and 22-kD alpha-zeins / S. Huang [et al.] // *Plant. Mol. Biol.* – 2006. – Vol. 61, № 3. – P. 25–35.
12. Symposium on Nutrition Security for India. Issues and Way forward // Indian National Science Academy / [Electronic resource]. – 2009. – Mode of access: http://typo3.fao.org/fileadmin/user_upload/fsn/docs/Symposium_Report_Nutrition_Security_India.pdf. – Date of access: 08.12.2011.
13. Starch metabolism in tubers of transgenic potato (*Solanum tuberosum*) with increased ADP-glucose pyrophosphorylase / J. Lee [et al.] // *Biochem. J.* – 1996. – Vol. 320, Part 2. – P. 493–498.
14. Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects / Pooja Bhatnagar-Mathur [et al.] // *Plant Cell. Rep.* – 2008. – Vol. 27, № 3. – P. 411–424.
15. Transgenic plants tolerant to abiotic stresses / Ya. S. Kolodyazhnaya [et al.] // *Cytology and Genetics*. – 2009. – Vol. 43, № 2. – P. 132–149.
16. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance / W. Wang [et al.] // *Planta*. – 2003. – Vol. 218, № 1. – P. 1–17.
17. International Service For The Acquisition Of Agri-Biotech Applications [Electronic resource]. – Mode of access: www.isaaa.org. – Date of access: 30.07.14.
18. McHughen A. Pandora's picnic basket. The Potential and Hazards of Genetically Modified Foods / A. McHughen. – New York: Oxford University Press Inc., 2000. – 281 p.
19. Nopalín Ti-plasmid, pTiT37, T-DNA insertion into a flax genome / A.G. Hepburn [et al.] // *J. Mol. Appl. Genet.* – 1983. – Vol. 2, № 2. – P. 211–224.
20. Genetic transformation of flax (*Linum usitatissimum* L.) by *Agrobacterium tumefaciens*. Regeneration of transformed shoots via callus phase / N. Basiran [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 1987. – Vol. 6, № 5. – P. 396–399.
21. Regeneration of flax plants transformed by *Agrobacterium rhizogenes* / X. Zhan [et al.] // *Plant Mol. Biol.* – 1988. – Vol. 11, № 5. – P. 551–559.
22. Glyphosate tolerant flax plants from *Agrobacterium*-mediated gene transfer / M.C. Jordan [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 1988a. – Vol. 7, № 4. – P. 281–284.
23. McHughen, A. *Agrobacterium* mediated transfer of chlorsulfuron resistance to commercial flax cultivars / A. McHughen // *Plant Cell Rep.* – 1989. – Vol. 8, № 8. – P. 445–449.
24. Development and preliminary field testing of a glufosinate-ammonium tolerant transgenic flax / A. McHughen [et al.] // *Can. J. Plant Sci.* – 1995. – Vol. 75, № 1. – P. 117–120.

25. High efficiency *Agrobacterium*-mediated gene transfer to flax / L. Mlynarova [et al.] // Plant Cell Rep. – 1994. – Vol. 13, № 5. – P. 282–285.
26. Patterns of transformation intensity on flax hypocotyls inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* / J.Z. Dong [et al.] // Plant Cell Rep. – 1991. – Vol. 10, № 11. – P. 555–560.
27. An improved procedure for production of transgenic flax plants using *Agrobacterium tumefaciens* / J.Z. Dong [et al.] // Plant Sci. – 1993(a). – Vol. 88, № 1. – P. 61–71.
28. A preculture period prior to *Agrobacterium tumefaciens* inoculation increases production of transgenic plants / McHughen A. [et al.] // J. Plant. Physiol. – 1989. – Vol. 135, № 2. – P. 245–248.
29. Transgenic flax plants from *Agrobacterium tumefaciens* transformation – incidence of chimeric regenerants and inheritance of transgenic plants / J.Z. Dong [et al.] // Plant Sci. – 1993(b). – Vol. 91, № 2. – P. 139–148.
30. Construction of intron-containing marker gene: Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation / G.Vancanneyt [et al.] // Mol Gen Genet. – Vol. 220, № 2. – P. 245–250.
31. The use of the phosphomannose isomerase gene as alternative selectable marker for *Agrobacterium* mediated transformation of flax (*Linum usitatissimum*) / F. Lamblin [et al.] // Plant Cell Rep. – 2007. – Vol. 26, № 6. – P. 765–772.
32. Expression of β -1,3-glucanase in flax causes increased resistance to fungi / M. Wrobel-Kwiatkowska [et al.] // Physiol. Mol. Plant Pathol. – 2004. – Vol. 65, № 5. – P. 245–256.
33. Wijayanto, T. Gene transfer to flax (*Linum usitatissimum* L.) using particle bombardment: M.Sc. diss. / T. Wijayanto; University of Saskatchewan – Saskatoon, SK, Canada, 1998.
34. Genetic transformation of *Linum* by particle bombardment / Wijayanto T [et al.] // In vitro Cell Dev. Biol. Plant – 1999. – Vol. 35, № 6. – P. 456–465.
35. Evaluation of putative seed-specific promoters for *Linum usitatissimum* / H.S. Drexler [et al.] // Mol. Breeding. – 2003. – Vol. 11, № 2. – P. 149–158.
36. Чикризова, О.Ф. Создание форм льна-долгунца на основе генетической трансформации *A. tumefaciens*: автореф. дис. ... канд. сельхоз. наук: 06.01.05, 03.00.23 / О.Ф. Чикризова; Всерос. научно-исслед. инст. Льна. – Москва, 1997. – 18 с.
37. Plant cell and biotechnology studies in *Linum usitatissimum* – a review / S. Millam [et al.] // Plant Cell Tissue Org. Cult. – 2005. – Vol. 82, № 1. – P. 93–103.
38. Гузенко, Е.В. Трансформация различных генотипов льна-долгунца с помощью *Agrobacterium tumefaciens*: предварительные результаты / Е.В. Гузенко, В.А. Лемеш, А.И. Емец, Я.Б. Блюм, Н.А. Картель // Факторы экспериментальной эволюции организмов: материалы IV межд. науч. конф., Алушта, 22–26 сент. 2008 г. / НАН Украины, НААН Украины, Укр. Об-во генетиков и селекционеров им. М.И. Вавилова; редкол. В.А. Кунах и др. – К.: Логос, 2008. – С. 268–273.
39. Оптимизация условий получения трансгенных растений льна-долгунца, устойчивых к гербицидам группы хлорсульфурина / О.Ф. Чикризова [и др.] // Сельхоз. Биология. – 1996. – № 3. – С. 117–121.
40. Каляева, М.А. Разработка эффективной системы генетической трансформации льна и дикорастущих видов рода *Linum*: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.12. / М.А. Каляева. – Пушино, 2001. – 145 с.
41. Hygromycin B – an alternative in flax transformation selection / S. Rakousky [et al.] // Plant. – 1999. – Vol. 42, № 3. – P. 361–369.
42. Белоногова М.А. Генетическая трансформация льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) с использованием семядольных эксплантов: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.12 / М.А. Белоногова. – Москва, 2006. – 129 с.
43. Lignin deficiency in transgenic flax resulted in plants with improved mechanical properties / M. Wrobel-Kwiatkowska [et al.] // J. Biotechnol. – 2007a. – Vol. 128, № 4. – P. 919–934.
44. Engineering of PHB Synthesis Causes Improved Elastic Causes Improved Elastic Properties of Flax Fibers / M. Wrobel-Kwiatkowska [et al.] // Biotechnol. Prog. – 2007b. – Vol. 23, № 1. – P. 269–277.
45. Sonication assisted *Agrobacterium*-mediated transformation enhances the transformation efficiency in flax (*Linum usitatissimum* L.) / M. Beranova [et al.] / Plant Cell Tiss Organ Cult Springer Science+Business Media. – 2008.

46. Green fluorescent proteins as a vital marker for non-destructive detection of transient transformation events in flax explants / J. Bleho [et al.] // *Agriculture (Poľnohospodárstvo)*. – 2010. – Vol. 56, № 4. – P. 99–105.
47. Введение в культуру *in vitro* и регенерационная способность сортов льна-долгунца с различной устойчивостью к полеганию / О.А. Баер [и др.] // *Физиол. биохим. культ. растений*. – 2004. – Т. 36, № 1. – С. 48–54.
48. Шут, М.В. Культура *in vitro* и регенерация растений льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.), районированных в Беларуси / М.В. Шут // *Весці НАНБ*. – 2005. – Т. 2, № 5. – С. 110–112.
49. Лемеш, В.А. Морфогенез и регенерационная способность сортов льна-долгунца, районированных в Беларуси / В.А. Лемеш, М.В. Богданова, Е.В. Гузенко, Л.В. Хотылева // *Доклады НАН Беларуси*. – 2006. – Т. 50, № 6. – С. 81–83.
50. Visualisation of microtubules in living cells of transgenic *Arabidopsis thaliana* L. / K. Ueda [et al.] // *Protoplasma*. – 1999. – Vol. 206, № 1. – P. 201–206.
51. Altered microtubule dynamics by expression of modified gfp-tubulin protein causes right-handed helical growth in transgenic *Arabidopsis* plants / T. Abe [et al.] // *Plant J.* – 2005 – Vol. 43, № 2. – P. 191–204.
52. Microtubule dynamics in living root hair: transient slowing by lipochitin oligosaccharide nodulation signals / V.N. Vassileve [et al.] // *Plant Cell*. – 2005. – Vol. 17, № 6. – P. 1777–1787.
53. Пермякова, Н.В. Встраивание векторных последовательностей в геном трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) и моркови (*Daucus carota* L.): автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.15 / Н.В. Пермякова; Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН. – Новосибирск, 2008. – 26 с.
54. Создание генетически модифицированных растений льна (*Linum usitatissimum* L.) методом биолиственной трансформации / В.А. Лемеш [и др.] // *Весці НАН Беларусі. Сер. біял навук*. – 2010. – № 1. – С. 18–23.
55. Особенности развития и репродукции трансгенных растений льна-долгунца / В.А. Лемеш [и др.] / (в печати)
56. Особенности проявления и наследования TPD1-фенотипа у инсерционного мутанта табака с длительным периодом цветения / Т.В. Баврина [и др.] // *Физиол. растений*. – 2007. – Т. 54. – С. 730–737.
57. Чабан, И.А. Цитоэмбриологическое изучение трансгенных растений томатов с аномальным фенотипом / И.А. Чабан, М.Р. Халилуев, С.В. Долгов // Тезисы III Всероссийского симпозиума «Физиология трансгенного растения и фундаментальные основы биобезопасности». Москва, 18–21 октября 2010 г. – С. 84.
58. Преждевременный цитокинез в материнских клетках пыльцы трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) / Ю.В. Сидорчук [и др.] // *Цитология*. – 2008. – Т. 50, № 5. – С. 447–451.
59. Walbot, V. The plasticity of the plant genome – is it a requirement for success? / V. Walbot, C. Cullis // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 1983. – Vol. 1. – P. 3–11.
60. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures / T. Gaspar [et al.] // *J. Plant Growth Regulation*. – 2002. – Vol. 37. – P. 263–285.
61. Гузенко, Е.В. Морфо-генетический полиморфизм популяций льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.), сформированных на основе ложных трансформантов / Е.В. Гузенко, В.А. Лемеш, М.В. Богданова // *Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр.* – Минск: Право и экономика, 2012. – Т. 13. – С. 1–14.
62. Поляков, А.В. Биотехнология в селекции льна: Монография / А.В. Поляков. – 2-е изд-е. – М., 2010. – 201 с.
63. Кузнецова, О.И. Молекулярно-генетический анализ растений-регенерантов, полученных из длительно культивируемых каллусов гороха: автореф. дис. ... канд. биол. наук / О.И. Кузнецова. – М., 2005. – 19 с.
64. Полонецкая, Л.М. Сравнительный анализ стабильности и генотипической изменчивости признаков продуктивности популяций льна-долгунца *Linum usitatissimum* L., сформированных на основе регенерантов соматического происхождения / Л.М. Полонецкая В.И. Сакович, Л.В. Хотылева // *Материалы Международной научной конференции «Современные проблемы генетики»*, Минск, 17–18 ноября 2005 г.: Научные труды, Минск. – 2005. – С. 184.

65. Polymorphic microsatellite loci in *Linum usitatissimum* / C. Roose-Amsaleg [et al.] // Molecular Ecology Notes. – 2006. – Vol. 6. – P. 796–799.
66. Межсортовой полиморфизм геномов льна (*Linum usitatissimum* L.) по молекулярно-цитогенетическим маркерам / О.А.Рачинская [и др.] // Генетика. – 2011. – Т. 47, № 1. – С. 1–11.
67. An environmentally induced adaptive (?) insertion event in flax / Y. Chen [et al.] // Internat. Journ. Genet. and Molecular Biol. – 2009. – Vol. 1, № 3. – P. 38–47.
68. C. Bickel. Identification of genomic regions involved in stress responsiveness in flax by genetic mapping: PhD dissertation. – Case Western Reserve University. – 2011. – 178 p.
69. A site-specific insertion sequence in flax genotrophs included by environment / Y. Chen [et al.] // New Phytol. – 2005. – Vol. 167, № 1. – P. 171–180.
70. Cullis, C.A. Mechanisms and control of rapid genomic changes in flax / C.A. Cullis // Annals of Botany. – Vol. 95. – P. 201–206.

Дата поступления статьи 1 октября 2014 г.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА – НЕОТЪЕМЛЕМАЯ ЧАСТЬ ПЕРСОНАЛЬНОЙ И ПРЕВЕНТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

Обзорная статья

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Все заболевания человека генетически обусловлены, но в разной степени. Наследственные болезни зависят от генотипа на 100% – с ними ребёнок рождается, или они неминуемо проявляются в пожилом возрасте (болезни Паркинсона, Альцгеймера и др.). Большинство же заболеваний человека (в том числе простудные, инфекционные и травмы) являются многофакторными – к ним есть генетическая предрасположенность, но проявляются они при воздействии провоцирующих факторов. Генетические механизмы этих заболеваний менее изучены и сейчас привлекают внимание исследователей всего мира.

Новым направлением, объединившим усилия медиков и генетиков, стала так называемая медицина 4П, основными особенностями которой являются следующие:

1. Персонализированная медицина – выбор лечебных воздействий с учетом индивидуальных (генетических) особенностей конкретного человека.

2. Предиктивная (предсказательная) медицина – предсказание особенностей здоровья (заболевания, возможные в будущем, особенности реагирования и др.) конкретного человека, *до появления первых симптомов*.

3. Превентивная (предупредительная) медицина – проведение профилактических мероприятий в отношении возможных, предсказанных заболеваний до появления первых симптомов.

4. Партисипативная медицина – активное участие пациента в профилактике возможных заболеваний и их лечении.

Смысл **персонализированной медицины** состоит в лечении не болезни, а пациента. Лекарства должны назначаться согласно особенностям генотипа – уже существует 29 лекарственных средств, использование которых

требует проведения предварительного генотипирования. Так например, при лечении вирусного гепатита С необходимо тестирование пациента на носительство полиморфных вариантов гена интерлейкина 28b (C/T, rs12979860), которые влияют на эффективность противовирусной терапии хронического гепатита С. Успех применения ПЭГ-интерферона в сочетании с рибавирином достигается у 80% больных с генотипом C/C, у 40% с генотипом C/T и у 35% с генотипом T/T.

Генотипирование является также необходимым этапом **предиктивной и превентивной медицины**. Результаты исследования генетической предрасположенности к опасным многофакторным заболеваниям позволяют определять уровень риска той или иной патологии (предиктивные мероприятия), на основании этих данных формировать группы риска среди населения, осуществлять профилактику до появления первых симптомов (превентивные мероприятия).

При появлении первых симптомов заболевания генотипирование помогает корректно осуществлять раннюю диагностику патологий, определять тактику лечения, а также предотвращать тяжёлые осложнения и повторные случаи заболеваний. Всё это имеет большое социально-экономическое значение.

ДНК-диагностика предрасположенности к заболеваниям необходима как для лечащих врачей, так и для самого человека. Уже при рождении ребёнка можно составить его «генетический паспорт», в котором будет отражена его предрасположенность к заболеваниям. Зная о генетическом риске того или иного заболевания, человек может скорректировать свой образ жизни так, чтобы избежать влияния средовых факторов риска и тем самым предотвратить болезнь. В этом и заключается смысл **партисипативной медицины**.

Таким образом, медицина будущего 4П невозможна без использования генетических методов выявления предрасположенности к заболеваниям и травмам.

Лаборатория генетики человека Института генетики и цитологии НАН Беларуси, аккредитованная в области определения индивидуальных генетических особенностей человека, выполняет научные задания по исследованию генетических механизмов многофакторных болезней, а также оказывает услуги населению по выявлению генетической предрасположенности к социально-значимым (опасным и в то же время распространённым) заболеваниям, таким как сердечно-сосудистые заболевания, диабет, остеопороз, а также по определению риска невынашивания беременности.

Выполнение научных заданий осуществляется совместно с учреждениями Министерства здравоохранения РБ – ГУ «РНПЦ «Кардиология», ГУ «РНПЦ «Мать и дитя», УО «БГМУ», БелМАПО и др.

Методы молекулярно-генетического анализа

В качестве биологического материала для исследования используется ДНК, выделенная из буккального эпителия (соскоба с внутренней поверхности щеки).

Экстракцию ДНК из образцов биологического материала осуществляют стандартным методом с использованием коммерческого набора для выделения ДНК в соответствии с инструкцией производителя. Выделенные образцы ДНК хранят при -20°C .

Для идентификации полиморфизмов используется амплификация специфических последовательностей ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим разделением продуктов в полиакриламидном геле или с помощью системы детекции продуктов ПЦР в реальном времени.

Для идентификации ряда мутаций и полиморфных вариантов генов разработаны методики на основе tetra-primer ARMS PCR с использованием специально подобранных праймеров и реагентов, что позволяет оптимизировать временные и материальные затраты на проведение анализа. Генотипирование по полиморфизмам генов осуществлялось методом количественной ПЦР в реальном времени

с использованием праймеров, TaqMan-зондов и набора реагентов (Синтол, Россия). Детекция флюоресценции, а также первичная обработка результатов осуществлялись программным обеспечением прибора CFX96 (BIO-RAD, США) в автоматическом режиме. Для выявления однонуклеотидных замен некоторых генов проводился анализ длин амплификационных продуктов электрофоретическим разделением в 8%-ном полиакриламидном геле с последующей окраской бромистым этидием и визуализацией в проходящем ультрафиолетовом свете.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета анализа данных Microsoft Excel и программы Statistica 7.0. Для оценки влияния полиморфизмов на риск развития заболевания применяли коэффициент соотношения шансов (OR). Распределение соответствующих генотипов в исследуемых группах для всех проанализированных полиморфизмов проверяли на соответствие ожидаемому распределению Харди-Вайнберга.

ДНК-диагностика предрасположенности к острому инфаркту миокарда

По данным Всемирной организации здравоохранения, одной из главных причин инвалидизации и смертности во всем мире являются сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ). Они представляют собой группу болезней сердца и кровеносных сосудов, в которую входят инфаркт миокарда, ишемическая болезнь сердца, болезнь сосудов головного мозга, легочная тромбоэмболия и др. В крупных городах ежегодно регистрируется более 300 случаев инфаркта на каждые 100 тысяч жителей. Инфаркт миокарда недавно считался болезнью пожилых, но за последние годы наметилась тревожная тенденция – инфаркт «молодеет».

Вклад генетического компонента в риск инфаркта миокарда составляет более 50%. Одним из наиболее плодотворных подходов к изучению генетических механизмов развития инфаркта миокарда является выявление генетических маркеров, ассоциированных с развитием заболевания, с помощью молекулярно-генетических методов. Данного рода исследования дают возможность выделить группы генов, нарушение структуры и функционирования которых вносит наибольший вклад в развитие сердечно-сосудистой патологии.

логии, и на этой основе выявить группы лиц с более высоким генетическим риском развития заболевания.

Особую опасность представляют мутации факторов свёртываемости крови – мутация гена протромбина и Лейденская мутация, которые увеличивают риск артериальных и венозных тромбозов в 3–8 раз. Своевременное выявление этих мутаций позволяет проводить профилактику тромбофилий с помощью противосвёртывающих средств (антиагрегантов).

Сравнительный анализ популяционных частот мутации Factor V Leiden в разных странах позволяет сделать вывод, что она значительно чаще встречается у белокожего населения планеты по сравнению с людьми с темным цветом кожи, а также имеет место градиент уменьшения распространения мутации в странах Европы с севера на юг (рис. 1).

Для жителей Восточной Азии (Япония, Тайвань, Китай, Монголия, Гонконг), аборигенов Австралии характерно отсутствие данной мутации [1, 2]. В Южно-африканских странах среди всех проведенных исследований не зарегистрировано ни одного носителя мутации [1].

Полученная нами частота встречаемости мутации Factor V Leiden в белорусской популяции (3,0%) совпадает с популяционной частотой (2,9%), установленной ранее для Беларуси [3]. Эти величины наиболее близки к результатам, полученным в Италии (3,0%) [4] и России (2,6%) [2].

В нашей лаборатории совместно с РНПЦ «Кардиология» и РНПЦ «Мать и дитя» исследованы генетические механизмы предрасположенности к острому инфаркту миокарда (ИМ).

Исследования проведены по полиморфным вариантам генов, влияющих на активность и структуру фибриногена и пламиногена – белков, участвующих в процессе тромбообразования на конечных стадиях коагуляционного каскада: α -Fibrinogen Thr312Ala, Factor XIII Val34Leu, PAI-1 4/5G, Factor V Leiden, а также по гену *LDLR* (динуклеотидные повторы).

Образцы крови больных, перенесших острый инфаркт миокарда (180 чел.), были предоставлены Республиканским научно-практическим центром «Кардиология» МЗ Беларуси. Контрольная группа (278 чел.) состояла из лиц старше 50 лет, без явной сердечно-сосудистой патологии. В группе пациентов, перенесших инфаркт миокарда (ИМ), женщины составили 15,5% от выборки, а мужчины, соответственно, 84,5%. Такое распределение пациентов по полу в случайной выборке пациентов, перенесших ИМ, подтверждает тезис о том, что ИМ гораздо чаще бывает у мужчин [5].

У пациентов с ИМ обнаружено увеличение частоты гетерозигот Thr312Ala 1-го фактора свёртываемости крови (OR = 1,4), частоты встречаемости мутации Factor Veiden (V-ый фактор свёртываемости крови) (OR=2,3), частоты генотипа Leu /Leu Factor XIII (OR = 2,5), а также генотипа 4G/4G гена *PAI-1* (OR = 1,4). В группе пациентов с ИМ отмечено также значимое увеличение частот генотипов 7/8 TA (11,3%) и 8/10TA (8%) гена *LDLR* по сравнению с контролем (6% и 4% соответственно). Кроме того, у пациентов с инфарктом миокарда выявлены аллели гена *LDLR* с 11-ю динуклеотидными повторами, которые не встречаются в контрольной популяции, что позволяет сделать вывод о высокой информативности данного гена для оценки риска ИМ [6].

На рис. 2 представлен сравнительный анализ частот генотипов риска ИМ с уровнями этого заболевания в ряде стран Европы [7, 8]. Выявлена достоверная положительная корреляция между частотой заболеваемости ИМ и частотой генотипа 4G/4G гена *PAI* ($r = 0,8871$, $p < 0,0447$), что свидетельствует о том, что данный генотип вносит существенный вклад в развитие заболевания. В то же время для других факторов риска ИМ достоверной корреляции с частотой возникновения инфаркта миокарда не наблюдалось.

Доля носителей мутации на континентах

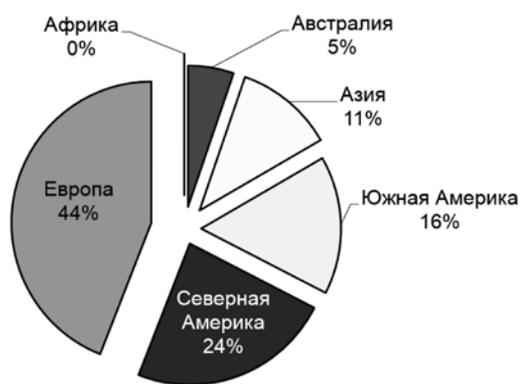


Рис. 1. Сравнение частот распространения мутации Factor V Leiden на разных континентах земного шара

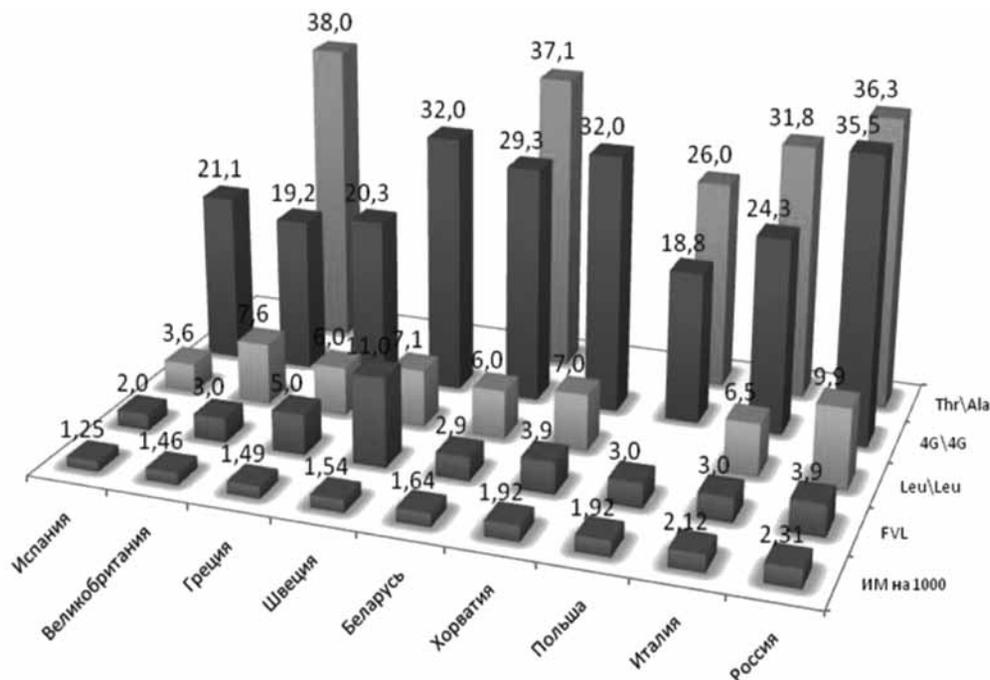


Рис. 2. Сравнение частот генотипов риска ИМ с уровнями этого заболевания в разных странах, % [7]

Известно, что в возникновении инфаркта миокарда большое значение имеют средовые факторы риска, такие как гиподинамия, стрессы, курение, диабет, гипертония и другие. Большинство перечисленных факторов связаны с уровнем социального и экономического развития страны, поэтому частота заболеваний во многом зависит от образа жизни людей в разных странах и может не совпадать с частотой генетических факторов риска.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что генотип 4G/4G гена *PAI-1* является наиболее информативным среди

рассматриваемых полиморфных вариантов для определения генетической предрасположенности к ИМ. Понятно, что к серьезному увеличению риска инфаркта миокарда приводят не отдельные аллели, а их сочетание в генотипе индивидуума, а также взаимодействие со средовыми факторами.

Сравнительный анализ полученных данных показал, что большее значение имеют не единичные факторы риска, а их сочетания. Так, наибольшим вкладом в предрасположенность к ИМ обладают аллельные варианты Thr\Ala_Leu\Leu_5G\5G; Ala\Ala_Val\Leu_4G\4G и Thr\Ala_Leu\Leu_4G\4G (табл. 1).

Таблица 1

Отношение частот сочетаний генотипов риска ИМ в исследованных группах

Комбинация генотипов	Отношение частоты встречаемости сочетаний генотипов в группе с ИМ к частоте встречаемости в контрольной группе
Thr\Ala_Val\Leu_4G\5G	1,2
Thr\Ala_Val\Leu_4G\4G	1,2
Thr\Ala_Val\Val_5G\5G	1,4
Thr\Ala_Val\Val_4G\5G	1,6
Thr\Ala_Val\Val_4G\4G	1,8
Thr\Thr_Leu\Leu_4G\4G	1,8
Thr\Ala_Leu\Leu_5G\5G	2,7
Ala\Ala_Val\Leu_4G\4G	2,9
Thr\Ala_Leu\Leu_4G\4G	4,0

Судя по данной таблице, явно прослеживается тенденция, что чем больше аллельных вариантов риска ИМ в комбинации, тем чаще встречается данная комбинация в группе пациентов с ИМ. Так, при наличии в комбинации одновременно вариантов Thr\Ala и Leu\Leu частота её встречаемости у пациентов в 2,7 раза выше, чем в контроле. Частоты сочетаний Thr\Ala+Leu\Leu+4G\4G и Ala\Ala+Val\Leu+4G\4G в контрольной группе и в группе пациентов, перенесших ИМ, различаются в 2,9–4 раза. Очевидно, эти комбинации аллельных вариантов вносят наибольший вклад в предрасположенность к сердечно-сосудистым заболеваниям.

Показано также, что наследственная предрасположенность к ИМ чаще реализуется в более раннем возрасте, причем, чем больше у человека факторов риска ИМ, тем раньше реализуется эта предрасположенность, а с увеличением возраста увеличивается вклад средовых факторов.

Нами разработаны и утверждены Министерством здравоохранения РБ методические рекомендации по ДНК-диагностике генетической предрасположенности к тромбофилиям различного происхождения. Рекомендации внедрены в РНПЦ «Кардиология», в Городской кардиологический центр при 9-й клинической больнице и в РНПЦ «Гематология и трансфузиология» (ныне РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий) МЗ РБ.

Потребность в ДНК-диагностике генетической предрасположенности к тромбофилиям в Беларуси составляет не менее 1 млн. человек. Лечение одного больного в кардиохирургии обходится государству порядка 100 долларов США в день. Снижение числа опасных патологий с помощью генетического тестирования составит существенную экономию средств, а также будет иметь огромное социальное значение.

Кардиометаболический синдром – новая пандемия XXI века

Вопросы профилактики, диагностики и лечения кардио-метаболических нарушений (КМН) представляют собой острейшую медико-социальную проблему современности. Некоторые эксперты ВОЗ считают КМН новой пандемией XXI века, охватывающей индустриально развитые страны. Это может оказаться демогра-

фической катастрофой для развивающихся стран. Распространённость метаболического синдрома в два раза превышает распространённость сахарного диабета, и в ближайшие 25 лет ожидается увеличение темпов его роста на 50%. [9]

Согласно современным концепциям, кардио-метаболические нарушения – это кластер гормональных и метаболических нарушений, взаимосвязанных факторов риска развития сердечно-сосудистых заболеваний и сахарного диабета. Развитие КМН обусловлено сложным взаимодействием наследственных и средовых факторов. Наиболее важными факторами внешней среды, способствующими развитию КМН, являются избыточное употребление пищи, содержащей жиры и сахара, и низкая физическая активность, приводящие к избыточному весу и ожирению.

Необходимо подчеркнуть, что большинство пациентов с КМН – это люди активного трудоспособного возраста, наиболее продуктивная и значимая доля общества. Кроме того, за последние два десятилетия изучаемый синдром демонстрирует устойчивый рост среди молодёжи и детей. Стремительное увеличение распространённости КМН в различных возрастных группах обуславливает необходимость определения их генетических механизмов с целью поиска эффективных современных подходов к профилактике и лечению как самих нарушений в комплексе, так и отдельных компонентов.

Нами проанализировано более 400 образцов ДНК пациентов с кардиометаболическими нарушениями и 350 человек контрольной группы. Полученные данные о распределении частот генотипов и аллелей полиморфизмов 10 генов – кандидатов риска КМН – позволили выявить полиморфизмы и мутации, которые вносят существенный вклад в генетическую предрасположенность к КМН.

По результатам генотипирования выявлено статистически достоверное различие в распределении частот генотипов и аллелей полиморфизма I/D гена *ACE* среди пациентов с КМН и в контрольной группе ($\chi^2 = 4,49$ и $\chi^2 = 4,36$, соответственно, $p < 0,05$). При этом наличие генотипа D/D способствует увеличению риска заболевания в 1,33 раза, а частота аллеля риска D достоверно выше среди пациентов с КМН по сравнению с контролем (OR = 1,36 95% CI 1,02–1,82) [10].

Наиболее выраженные различия между частотами генотипов и аллелей в исследованных выборках наблюдались для полиморфизма С/Т гена *TCF7L2* ($\chi^2 = 8,10$ и $\chi^2 = 8,76$, соответственно, $p < 0,01$). В связи с низкой частотой гомозигот Т/Т в популяции, генотипом риска для этого полиморфизма является гетерозигота Т/С: среди пациентов с КМН частота этого генотипа значительно выше, чем в контрольной группе (44,4% и 27,9% соответственно). В то же время генотип С/С является протекторным (OR = 0,49 95% CI 0,32–0,74). Полученные данные свидетельствуют о значительном вкладе полиморфизма С/Т гена *TCF7L2* в патогенез развития КМН (рис. 3).

При анализе результатов генотипирования группы лиц с сахарным диабетом 2 типа (СД 2) по полиморфизму Pro/Ala гена *PPARG* нами наблюдалось статистически достоверное снижение частоты аллеля Ala (OR = 0,57 95% CI 0,33–0,99) среди пациентов с СД 2 по сравнению с контролем (рис. 4). В то же время аллель Pro является аллелем «дикого типа», его частота в белорусской популяции составляет более 80%.

Таким образом, по результатам проведенного исследования, наибольшим вкладом в генетическую предрасположенность к КМН из проанализированных генов обладают *TCF7L2*, *ACE*, *UCP2* и *PPARG*. Генетическое

тестирование по этим генам можно проводить с целью формирования групп повышенного риска развития данного заболевания. Выявление аллельных вариантов генов, обуславливающих повышенный в 1,5–2 раза риск развития кардио-метаболических нарушений, позволяет создать базу для разработки диагностических методов прогнозирования течения заболевания и разработать мероприятия по профилактике кардиометаболических нарушений.

ДНК-диагностика для корректировки персональной фармакологической поддержки

Коррекция метаболических нарушений часто проводится с помощью специфических противогипоксических средств (антигипоксантов). Опыт использования этих препаратов показал, что эффективность их применения варьирует в широких пределах и в значительной степени зависит от индивидуальной устойчивости организма к гипоксии. Лица с различной устойчивостью к гипоксическому воздействию имеют ряд различий (биохимических, физиологических, психологических), влияющих как на характер адаптации к гипоксии, так и на эффективность применения антигипоксантов. Показано, что большинство этих различий являются генетически обусловленными.

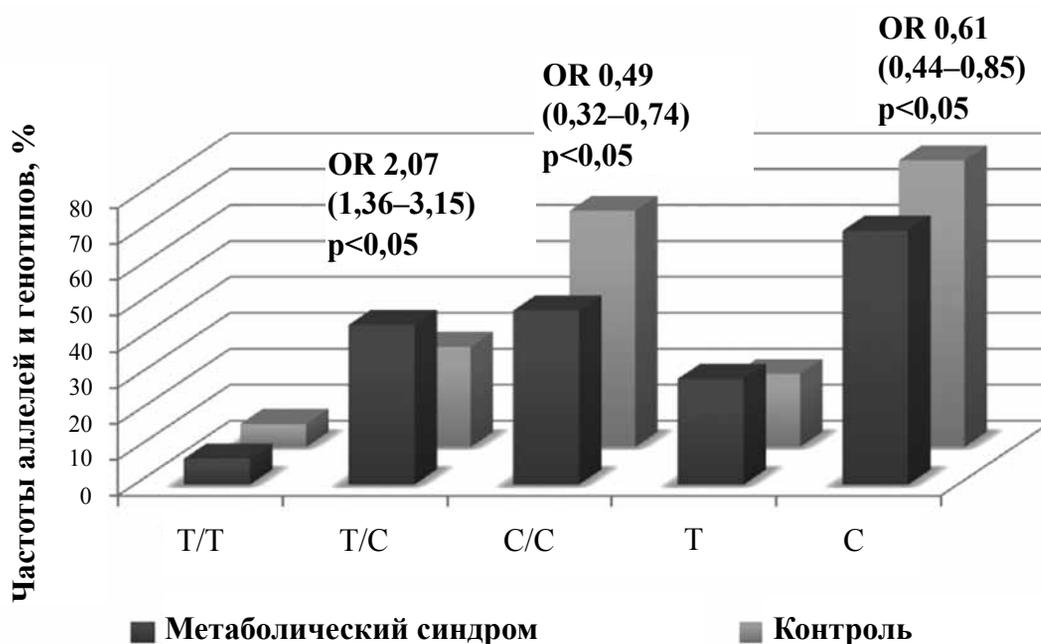


Рис. 3. Частоты генотипов и аллелей гена *TCF7L2* С/Т в исследованных группах

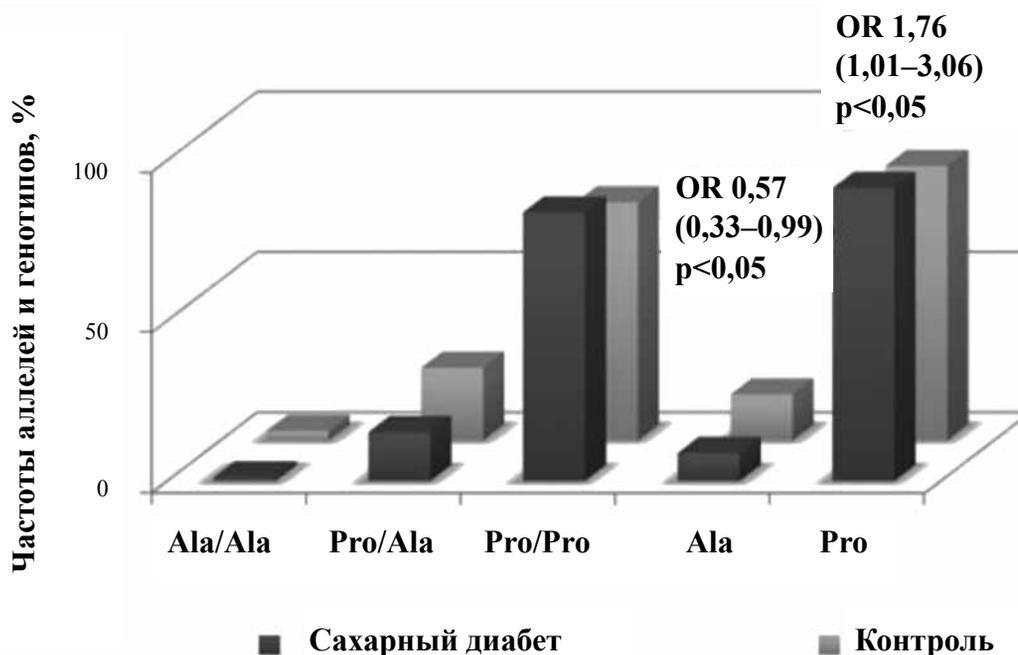


Рис. 4. Частоты генотипов и аллелей полиморфизма Pro/Ala гена *PPARG* в исследованных группах

Соответственно, подход к выбору фармакологического обеспечения должен быть строго индивидуальным. В связи с этим, исследование полиморфизма генов, контролирующих процессы, способные влиять на устойчивость организма к гипоксии, представляет значительный интерес с точки зрения организации медико-биологического и фармакологического обеспечения профессиональной деятельности лиц экстремальных профессий.

Исследование переносимости гипоксии позволяет выявлять группы лиц с различной фенотипической устойчивостью к действию гипоксического стимула, однако показатели фенотипической устойчивости не стабильны. Они могут меняться даже в течение часа в зависимости от различных внутренних и внешних факторов. Единственной возможностью адекватного определения выносливости человека является выявление генетически детерминированной устойчивости к гипоксии, которая постоянна, не меняется в течение всей жизни и не зависит ни от внутренних, ни от внешних факторов.

Исходя из этого, нами выполнено исследование образцов геномной ДНК у тренированных лиц – спортсменов и сотрудников спецподразделений силовых ведомств – на наличие полиморфных вариантов в 13 генах,

способствующих быстрому и адекватному ответу на гипоксический стресс, формирующих общую устойчивость к гипоксии, а также регулирующих процессы энергетического метаболизма: *ACTN3*, *ACE*, *AMPD1*, *PAI-1*, *MB*, *BDKRB2*, *HIF1A*, *EPO*, *LDLR*, *NOS3*, *PPARG*, *UCP2*, *VEGF*.

При определении устойчивости каждого человека к гипоксии учитывали роль различных аллелей или генотипов в генетической предрасположенности к выносливости – чем больше в генотипе благоприятных аллельных вариантов (в том числе редких) и меньше отрицательных, тем больше выносливость человека. Обращает на себя внимание факт, что подавляющее большинство лиц экстремальных профессий имеет в генотипе от 1 до 3 редких благоприятных вариантов генов. Тем не менее, испытуемых можно разделить на группы (рис. 5):

- высокоустойчивые к гипоксии;
- среднеустойчивые к гипоксии;
- низкоустойчивые к гипоксии.

Эти данные хорошо коррелировали с результатами определения устойчивости к гипоксии, определённой по клинико-биохимическим тестам в РНПЦ «Кардиология» (рис. 5).

Следовательно, лица экстремальных профессий, которые априори должны отличаться

выносливостью, тем не менее различаются по своей генетически детерминированной устойчивости к гипоксии. Поэтому для разработки схем назначения фармакологических препаратов необходимо учитывать данные генетического анализа.

В качестве препарата, повышающего резистентность организма к воздействию различных повреждающих факторов, широко используется Мексibel. Он относится к группе субстратных антигипоксантов с антиоксидантными свойствами. Многочисленные клинико-физиологические эффекты Мексибела являются основанием для их широкого применения у лиц экстремальных профессий с целью улучшения функционального состояния и повышения физической работоспособности.

Нами установлено, что наиболее значительное влияние на уровень физической работоспособности и метаболические параметры ее обеспечения Мексibel оказывал у лиц с низкой и средней устойчивостью к гипоксии. У них применение препарата вызвало достоверное снижение времени выполнения нагрузочного теста (с $13,7 \pm 0,02$ с до $12,4 \pm 0,1$ с; $X \pm S.E.M.$; $p \leq 0,05$; критерий знаков) и увеличение средней мощности выполненной работы (с $592 \pm 20,8$ Вт до $688 \pm 21,6$ Вт). Следовательно, курсовое применение Мексибела способно повышать у низкоустойчивых лиц

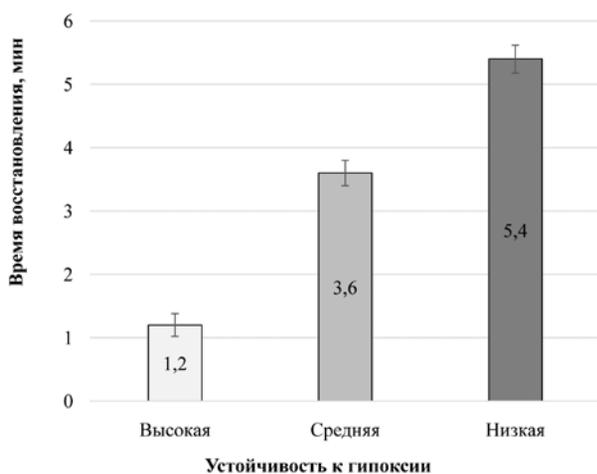


Рис. 5. Время восстановления процентного содержания кислорода в периферической крови после прекращения дыхания гипоксической смесью у лиц экстремальных профессий с разной устойчивостью к гипоксии (время дыхания ГГС = 5 мин)

переносимость высоких физических нагрузок, ускорять постнагрузочное восстановление, препятствуя таким образом развитию синдрома перетренированности.

Однако применение Мексибела малоэффективно (а иногда даже не целесообразно) для лиц, высокоустойчивых к гипоксии.

Таким образом, предварительное генетическое тестирование позволяет улучшить качество фармакологической поддержки и, в частности, антигипоксидантной терапии с применением мексибела у спортсменов и лиц экстремальных профессий.

Роль молекулярно-генетических факторов в развитии остеопороза

Исследование генетических механизмов остеопороза проведено по договору о научном сотрудничестве между Государственным научным учреждением «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» и Государственным научно-исследовательским институтом «Центр инновационной медицины» (Литовская Республика) в рамках программы двустороннего сотрудничества между Беларусью и Литвой в области науки и технологий на 2011–2012 гг.

Остеопороз (ОП) – системное заболевание скелета, характеризующееся снижением прочности костной массы, изменением её структуры и повышенным риском переломов. По данным Всемирной организации здравоохранения, у 15–20% людей старше 50 лет выявляются остеопоротические изменения, причем у 30% из них это может привести к опасным инвалидизирующим переломам.

Костная ткань является важнейшим источником кальция для поддержания его нормального физиологического уровня в организме. При нарушении «баланса» под влиянием ряда факторов, к которым относятся особенности питания, курение, прием лекарственных средств, гормональные нарушения и т.д., количество резорбируемой (отдающей кальций) костной ткани превышает количество формируемой, и плотность костной ткани снижается, что ведет к развитию остеопороза. Исследования показали, что минеральная плотность кости на 60–85% зависит от генотипа человека, и природа этой наследственности закодирована во многих генах.

Нами проведено генотипирование пациенток с ОП и контрольной группы по полиморфизмам *ApaI*, *BsmI*, *TaqI*, *Cdx2* гена *VDR*, G2046T гена *COL1A1* и T-13910C гена *LCT*, участвующих в регуляции минеральной плотности костной ткани (МПК). Выявлены полиморфизмы, которые вносят наибольший вклад в развитие постменопаузального остеопороза, установлены частоты их носительства в популяциях Беларуси и Литвы, а также их взаимосвязь с уровнем МПК. Наиболее выраженная ассоциация наблюдалась между уровнем МПК и полиморфизмами *ApaI* и *TaqI* гена *VDR* [11–13].

Результаты работы свидетельствуют о том, что полиморфизмы *ApaI*, *BsmI* и *TaqI* гена *VDR* и T-13910C гена *LCT* повышают риск развития остеопороза (рис. 6, 7). Для полиморфизмов *Cdx2* гена *VDR* и G2046T гена *COL1A1* также была обнаружена взаимосвязь с риском развития ОП, однако статистически недостоверная, что, возможно, является следствием недостаточной выборки.

Полученные результаты использованы для проведения скрининга генетических маркеров среди населения Беларуси для определения генетической предрасположенности к развитию остеопороза. Разработанная технология определения генетической предрасположенности к остеопорозу внедрена в Минский Городской центр профилактики остеопороза и в Литовский Национальный центр остеопороза (г. Вильнюс). Разработанная технология легла

в основу методических рекомендаций «Риск остеопоротических переломов и его ранняя оценка с помощью полиморфизмов генов *VDR*, *COL1A1* и *LCT*», утвержденных и опубликованных в Литовской Республике.

Роль генетических факторов в предрасположенности к невынашиванию беременности

Проблема бесплодия и невынашивания беременности становится все более актуальной. В условиях неблагоприятной демографической ситуации, когда каждые пять лет на 20% уменьшается число женщин, способных родить ребенка, особенно важно сохранение и развитие беременности у супружеских пар, желающих иметь детей.

По данным Министерства здравоохранения, в Беларуси 10–25% беременностей оканчивается неудачно, причём этот показатель с 1998 года вырос на 8%.

В последнее время одной из главных причин выкидышей стали считать тромбофилию – патологическое состояние организма, характеризующееся повышенной склонностью к тромбообразованию. К тромбофилии могут приводить изменения генов, ответственных за систему гемостаза, поэтому большой интерес представляет изучение генетических полиморфизмов, при которых происходят те или иные изменения в процессах свёртывания крови.

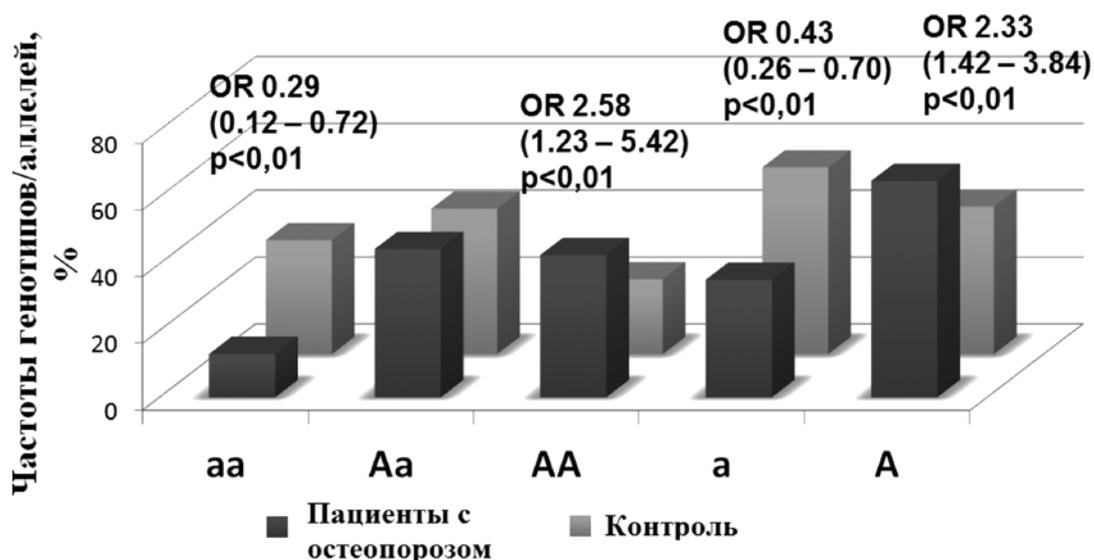


Рис. 6. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфизма *ApaI* гена *VDR* контрольной группы и пациентов с ОП

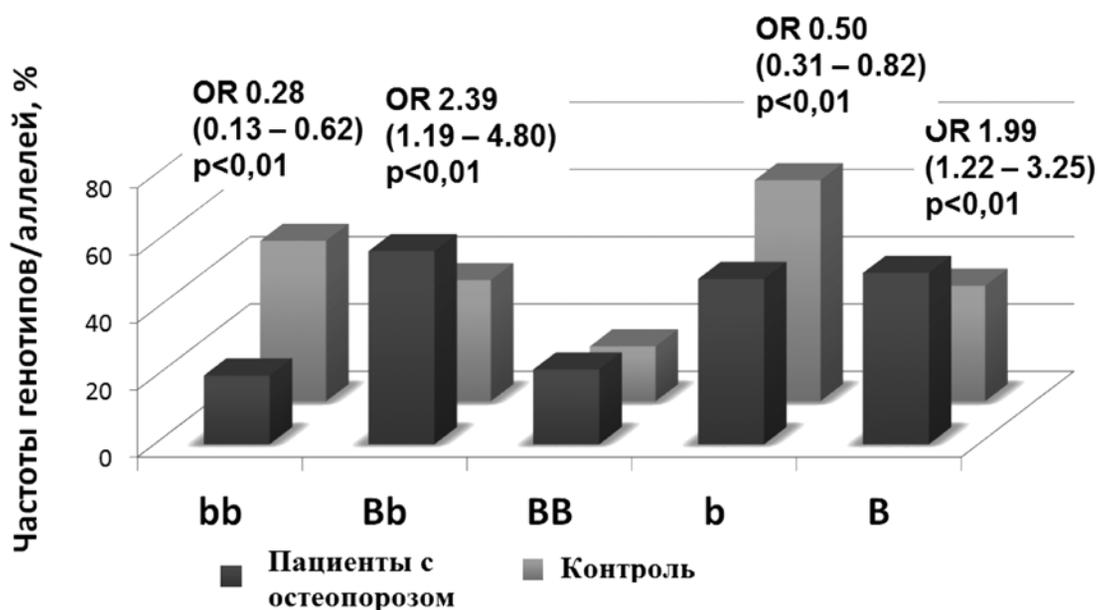


Рис. 7. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфизма BsmI гена *VDR* контрольной группы и пациентов с ОП

Исследования последних лет показали, что наличие генетической предрасположенности к тромбофилии сопряжено с повышенным риском развития осложнений во время беременности (привычное невынашивание, плацентарная недостаточность, задержка роста плода, поздний токсикоз и др.).

Генетический риск тромбофилии часто реализуется только при дополнительных условиях, одним из которых как раз и является беременность. При этом клинико-биохимические анализы в начале не выявляют отклонений от нормы, но при развитии беременности образуются микротромбы в плаценте, и происходит самопроизвольный выкидыш или замершая беременность.

Среди причин генетических тромбофилий в литературе широко обсуждается причинно-следственная связь между мутациями фактора V Leiden, мутации G20210-A в гене протромбина, C677-T в гене метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*), полиморфизмами 4G/5G в гене ингибитора активатора плазминогена I (*PAI-1*), G/A 455 в гене фибриногена и развитием тяжелого гестоза, задержки внутриутробного развития плода, преждевременной отслойки нормально расположенной плаценты и другими осложнениями [14–21].

Большое значение в формировании генетической предрасположенности к невынашива-

нию имеет не только носительство аллелей риска по отдельности, но и их комбинации.

В связи с этим, изучение причин генетической предрасположенности к невынашиванию беременности имеет важную и неоспоримую значимость, что и явилось целью нашей работы. ДНК-анализ аллелей генов риска позволяет выявлять причины нарушений беременности в каждом конкретном случае, что даёт возможность терапевтической коррекции эффектов этих неблагоприятных аллелей и обеспечивает нормальное протекание процесса беременности.

Проведена оценка информативности генов-кандидатов риска невынашивания беременности для белорусской популяции. Изучение и сопоставление частот встречаемости вариантов генов-кандидатов риска у пациенток с патологией беременности (500 человек) по сравнению с контрольной группой (350 чел.) позволило выявить аллельные варианты, обладающие наибольшей прогностической ценностью. По нашим данным, факторами риска патологии беременности для белорусской популяции можно считать наличие следующих аллельных вариантов генов: D/D гена *ACE*, 4G/5G и 4G/4G гена *PAI-1*; Ala/Ala гена *F1*, Val/Leu и Leu/Leu гена *F13*, кроме того в гене *eNOS* варианты T/T (G894T), 4a/4a и 4b/4a, а также в гене *MTHFR* варианты T/T (C677-T), C/C(A1298C) и компаунд C/T + A/C.

Наиболее выраженные различия между частотами генотипов и аллелей в исследуемых выборках наблюдались для полиморфизмов 4G/5G гена *PAI-1* ($\chi^2 = 58,37$ и $\chi^2 = 67,59$, соответственно, $p < 10^{-10}$) и С/Т гена *MTHFR* ($\chi^2 = 43,44$ и $\chi^2 = 47,75$, соответственно, $p < 10^{-10}$). При этом наличие генотипа 4G/4G гена *PAI-1* увеличивает риск патологии беременности в 1,9 раза, наличие генотипа 4G/5G – в 1,7 раза, а частота аллеля риска 4G достоверно в 2,1 раза выше у пациенток с невынашиванием беременности по сравнению с контролем (OR = 2,10. 95% CI 1,76–2,51). Частота встречаемости полиморфных генотипов 4G/5G и 4G/4G у пациенток в сумме составляет 79%, что значительно выше, чем в контроле (54%). Полученные данные свидетельствуют о значительном вкладе полиморфизма 4G/5G гена *PAI-1* в патогенез развития патологии беременности.

Наличие генотипа Т/Т гена *MTHFR* увеличивает риск патологии в 3,5 раза (OR = 3,50 95% CI 1,82–6,75), а генотип С/Т того же гена – в 2,1 раза (OR = 2,10 95% CI 1,51–2,90). Частота аллеля риска Т достоверно выше у женщин с невынашиванием беременности по сравнению с контролем (OR = 2,46 95% CI 1,90–3,18).

При сравнении генотипов пациенток и контрольной группы также выявлены достоверные различия в распределении аллельных вариантов полиморфизма А/С гена *MTHFR* ($\chi^2 = 10,28$ и $\chi^2 = 10,49$, соответственно, $p < 0,01$). Так, наличие генотипов А/С и С/С увеличивает риск невынашивания беременности в 1,5 раза (OR = 1,48 95% CI 1,09–2,02 и OR = 1,51 95% CI 0,88–2,59, соответственно) и частота аллеля С также достоверно выше у пациенток (OR = 1,47 95% CI 1,17–1,87).

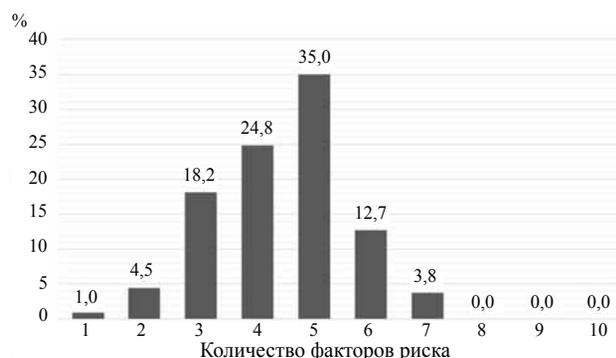


Рис. 8. Распределение частот генотипов с разным количеством факторов риска невынашиваемости беременности, %

Понятно, что чем больше факторов риска в генотипе, тем риск невынашивания беременности выше. Анализ генотипов 500 пациенток с невынашиванием беременности показал, что у 90,7% женщин, обследованных по 10 генам, количество факторов риска составляло от 3 до 6 (рис. 8). Причём больше трети пациенток (35%) имеют в генотипе пять факторов риска. Ровно 1% женщин с патологией беременности имеет только 1 неблагоприятный вариант гена.

Поскольку в формировании генетической предрасположенности к невынашиванию беременности имеет значение не только носительство аллельных вариантов риска по отдельности, но и их комбинации, проанализирована частота ряда сочетаний факторов риска в группе пациенток. Результаты анализа той же выборки, состоящей из 500 пациенток, представлены на рис. 9.

По полученным результатам можно сделать вывод, что чаще всего встречаются комбинации связанных с невынашиванием вариантов следующих генов: *FXIII + PAI* (41%), *eNOS* (4a/4b) + *PAI* (30%), *ACE + PAI* (26%) и *ACE + FXIII* (28%). Нередко встречается также комбинация из трёх факторов риска: *FXIII + PAI + eNOS* (4a/4b) – 15%.

Выявление носительства комбинаций данных полиморфизмов важно для выбора терапии у женщин с невынашиванием, поскольку профилактика и своевременная коррекция эффектов неблагоприятных вариантов генов обеспечивает нормальное протекание беременности. Клиентки, обследованные нами год назад и ранее, успешно родили детей, у многих беременность на поздних сроках, что также позволяет надеяться на успешное рождение младенцев.

Заключение

Разработанные в лаборатории методы молекулярно-генетического анализа успешно используются в Республиканском центре ДНК-биотехнологий для оказания услуг населению. К нам обращаются за «генетическими паспортами» не только граждане Беларуси, но и жители России, Украины, Латвии, Германии, США. Чаще всего их интересуют риски развития описанных выше заболеваний. Кроме того, очень востребованной является ДНК-диагностика нарушений беременности.

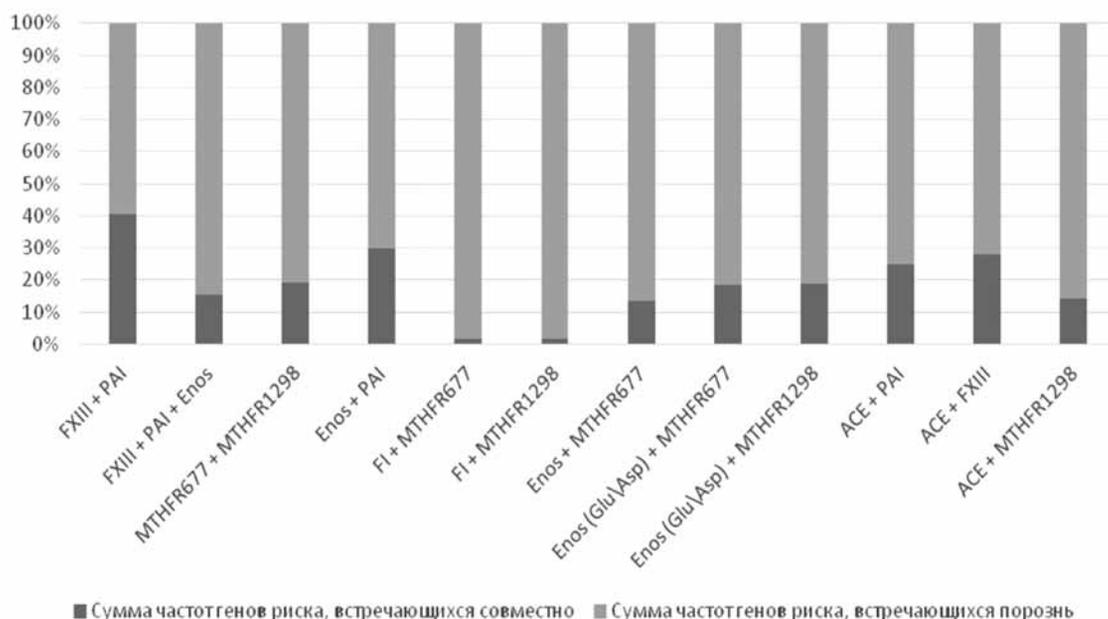


Рис. 9. Распределение частот встречаемости комбинаций генотипов, связанных с невынашиванием беременности

Полученные нами результаты ДНК-анализа используются в учреждениях Министерства здравоохранения Беларуси, поскольку они позволяют проводить не только раннюю диагностику заболеваний, но и профилактику осложнений и повторных случаев, а также корректно выбирать методы лечения.

Генетическая диагностика является необходимым этапом персональной и превентивной медицины. Именно генетика должна стать основой профилактики и лечения заболеваний. Преимущество генетической диагностики заключается в том, что она дает возможность выявить склонность к тому или иному заболеванию задолго до его клинических проявлений, вовремя принять профилактические меры, предотвратить развитие или облегчить течение заболевания, и применять терапию с учетом индивидуальных особенностей человека.

Таким образом, молекулярно-генетическое тестирование позволяет снизить инвалидизацию и смертность населения, в значительной мере повысить качество и продолжительность жизни пациентов, а также сократить расходы государства на их лечение.

Список использованных источников

1. Hong, S.H. Genotype Distribution of the Mutations in the Coagulation Factor V Gene in the Korean Population: Absence of Its Association with Coronary Artery Disease / S.H. Hong // Korean J Biol Sci. – 2003. – Vol. 7. – P. 255–259.

2. Гусина, А.А. Роль мутаций фактора II и фактора V свёртывания крови в развитии венозных тромбозов у жителей Республики Беларусь / А.А. Гусина // Медицинские новости. – 2007. – Т. 5. – С. 85–88.

3. The frequencies of mutations in Factor V (FV Leiden), Prothrombin (G20210A) and 5,10-methyltetrahydrofolate reductase (C677T) genes in Russian [In Russian] / E.A. Kalashnikova [et al.] // Medicinskaya Genetika. – 2006. – Vol. 7. – P. 68–72.

4. Rodeghiero, F. Activated protein C resistance and factor V Leiden mutation are independent risk factors for venous thromboembolism / F. Rodeghiero, A. Tosetto // Ann Intern Med. – 1999. – Vol. 130. – P. 643–650.

5. Гончар, А.Л. Роль генетических факторов в развитии инфаркта миокарда (гендерные и возрастные аспекты) / А.Л. Гончар, И.Б. Моссэ // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. – Минск, 2013. – Т. 15. – С. 7–15.

6. Вклад генов *PAI-1* (ингибитора активатора плазминогена) и *LDLR* (гена рецептора липопротеина низкой плотности) в комплекс экологических и генетических факторов, приводящих к инфаркту миокарда / И.Б. Моссэ [и др.] // Наукові праці. – Т. 169. Вип. 157. – Техногенна безпека. – Миколаїв: Вид-во ЧДУ ім. Петра Могили, 2011. – С. 49–55.

7. Сравнение популяционных частот генетических факторов риска инфаркта миокарда с уровнями этого заболевания в разных странах Европы / И.Б. Моссэ [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. – Минск, 2010. – Т. 11. – С. 45–54.
8. Molecular-genetic analysis of genetic predisposition to myocardial infarction and comparison of risk factor population rates in different countries / M. Gonchar // Radiobiology and Environmental Security. – Springer, 2011. – P. 111–126.
9. Zimmet, P. Preventing type 2 diabetes and the dysmetabolic syndrome in the real world: a realistic view / P. Zimmet // Diabetic. medicine. – 2003. – Vol. 20, № 9. – P. 693–702.
10. Генетические факторы риска развития метаболического синдрома / М.Д. Амелянович [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. – Минск, 2013. – Т. 16. – С. 24–31.
11. Association of *VDR BsmI* gene polymorphism, bone turnover markers and bone mineral density in severe postmenopausal osteoporosis / M. Tamulaitienė [et al.] // Gerontologija. – 2012. – Vol. 13 (4). P. 206–213.
12. Association Between Polymorphisms of *VDR*, *COL1A1*, and *LCT* genes and bone mineral density in Belarusian women with severe postmenopausal osteoporosis / P. Marozik [et al.] // Medicina (Kaunas). – 2013. – Vol. 49 (4). – P. 177–184.
13. Correlation between genetic and biochemical markers in Belarussian women with osteoporosis / P. Marozik [et al.] // Osteoporos Int (2014) 24 (Suppl 1). – P. 176.
14. Alpha-fibrinogen Thr312Ala polymorphism and venous thromboembolism / A.M. Carter [et al.] // Blood. – 2000. – Vol. 96. – P. 1177–1179.
15. Ассоциация наследственных факторов тромбофилии с невынашиванием беременности у женщин в русской популяции: отчет о НИР / ГУ Медико-генетический научный центр РАМН; Е.А.Калашникова, С.Н.Кокоровцева. – Москва, 2005. – 3 с. – № ГР 115478.
16. P05121 (PAI1_HUMAN) [Electronic resource] // The Universal Protein Resource (UniProt). – 2014. – Mode of access: <http://www.uniprot.org/uniprot/P05121>. – Date of access: 17.03.2014.
17. Endothelial nitric oxide synthase gene (NOS3) variant and hypertension in pregnancy [Electronic resource] // The National Center for Biotechnology Information. – 2001. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=11745998>. – Date of access: 18.03.2014.
18. NOS3 nitric oxide synthase 3 // The National Center for Biotechnology Information. [Electronic resource]. – 2014. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4846>. – Date of access: 17.03.2014.
19. Метилентетрагидрофолатредуктаза (MTHFR) [Электронный ресурс] // Helix. – 2014. – Режим доступа: <http://www.helix.ru/kb/item/18-019>. – Дата доступа: 18.03.2014.
20. Бескоровайная, Т.С. Влияние некоторых генетических факторов на нарушение репродукции у человека: дис. канд. мед. наук. – М., 2005. – 89 с.
21. Метилентетрагидрофолатредуктаза (MTHFR) – (Glu429Ala) [Электронный ресурс] // Helix. – 2014. – Режим доступа: <http://www.helix.ru/kb/item/18-008>. – Дата доступа: 18.03.2014.

Дата поступления статьи 28 августа 2014 г.

Н.В. Савина¹, Н.В. Никитченко¹, О.П. Романюк¹, Т.Д. Кужир¹, А.Л. Поляков², А.И. Ролевич², С.А. Красный²,
Р.И. Гончарова¹

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ДНК КАК ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ФАКТОР ПРОГРЕССИИ РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ: ИССЛЕДОВАНИЕ НА ПАЦИЕНТАХ БЕЛАРУСИ

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

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

²ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии

им. Н.Н. Александрова»,

Республика Беларусь, 223040, Минский р-н, п. Лесной 2

Введение

Рак мочевого пузыря (РМП) относится к наиболее распространенным онкологическим заболеваниям мочевыводящего тракта. В структуре онкологической заболеваемости он занимает 11 место с частотой 10–15 случаев на 100 000 населения в год [1, 2], а его лечение является наиболее экономически затратным [3]. РМП ежегодно диагностируется примерно у 1000 жителей Республики Беларусь и уносит жизни более 400 человек [4].

Согласно данным литературы, приблизительно 90% опухолей мочевого пузыря представлены уротелиальной карциномой, при этом по клиническим и гистологическим параметрам РМП разделяется на 2 основные группы: поверхностный (без мышечной инвазии, РМП БМИ) и мышечно-инвазивный [5, 6]. Большинство опухолей на момент постановки диагноза ($\geq 75\%$) являются неинвазивными и характеризуются по степени распространения как T_a–T₁. Мышечно-инвазивный рак ($\geq T_2$) регистрируется у 25% пациентов, которые обычно подвергаются цистэктомии и для которых характерен неблагоприятный прогноз (50%-ная смертность в течение 5-ти лет вследствие прогрессии и метастазирования). У 70–80% пациентов с РМП БМИ в течение 5-ти лет возникают рецидивы, причем у некоторых из них (в 10–20% случаев) наблюдается прогрессирование в мышечно-инвазивную форму.

В связи с интенсивным развитием персонализированной медицины уделяется большое внимание разработке критериев (или маркеров), позволяющих прогнозировать прогрессию и рецидивирование рака у отдельного пациента. В настоящее время выбор метода лечения и про-

гнозирование дальнейшего течения РМП базируются на его принадлежности к определенной классификационной категории по международной системе TNM (*Tumor; Nodulus, Metastasis*) [5]. Степень дифференцировки опухоли (G1, G2, G3) характеризует атипичность опухолевой ткани и ее злокачественный потенциал [5, 7, 8], поэтому этот показатель расценивается как один из наиболее значимых факторов прогноза после стадии заболевания. Европейская организация по исследованию и лечению рака (EORTC) разработала систему баллов для оценки риска рецидивирования и прогрессирования у каждого конкретного больного [7], которая учитывает такие клинические и морфологические признаки, как число и размер опухоли, частоту предшествующего рецидива, наличие сопутствующей CIS (карциномы *in situ*) и дифференцировку опухоли, при этом пациенты относятся к группам низкого, промежуточного и высокого риска [9]. Однако отдаленные результаты лечения пациентов, относящихся к одним и тем же классификационным подгруппам и получавших одинаковое лечение, существенно различаются. Становится все более ясным, что для полноценного прогноза необходима дополнительная информация, прежде всего, об индивидуальных генетически детерминированных факторах, определяющих как чувствительность клеток и организма к канцерогенезу, так и свойства самой опухоли. Известно, что среди таких факторов *немаловажную* роль играют гены репарации ДНК, мутации в которых могут оказаться специфическими по отношению к определенному типу злокачественных новообразований, а генетический полиморфизм влияет на риск возникновения рака [10]. Целью данного исследования

являлось генотипирование ДНК пациентов с РМП по нескольким генам эксцизионной репарации ДНК и анализ частоты определенных генотипов/аллелей в зависимости от клинико-морфологических параметров опухоли для выявления потенциальных молекулярно-генетических маркеров, ассоциированных с прогрессией рака. Исследования в этом направлении могут способствовать уточнению прогноза клинического течения рака и индивидуальному подходу к выбору адекватной тактики и методов лечения.

Материалы и методы

Группа обследования состояла из пациентов, подлежащих диагностической или лечебной трансуретральной резекции мочевого пузыря на базе отделения онкоурологической патологии РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова в 2011–2013 гг. Отбор биологического материала (периферической венозной крови) проводился сотрудниками медицинского учреждения после подписания участниками исследования информированного согласия; всем участникам гарантировалась конфиденциальность сведений личного характера. На каждого пациента оформлялся протокол, содержащий персональные данные, включая возраст, статус курильщика и длительность курения; клинические данные; морфологические данные (макроскопическое и микроскопическое описание опухоли). Стерильно взятые образцы цельной крови в количестве

3–5 мл хранились в вакуутайнерах с распыленным ЭДТА при температуре -20°C до начала молекулярно-генетических исследований.

Объект исследования – геномная ДНК, выделенная из образцов цельной венозной крови стандартным фенол-хлороформным методом.

Определение полиморфизма генов репарации ДНК *XPD* Asp312Asn (rs1799793), *XRCC1* Arg399Gln (rs25487), *OGG1* Ser326Cys (rs1052133) и *ERCC6* Met1097Val (rs2228526) проводили с помощью полимеразной цепной реакции с анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ методом). Схема исследования включала следующие этапы: 1) ПЦР (амплификация); 2) рестрикция; 3) детекция продуктов амплификации путем горизонтального электрофореза; 4) визуализация результатов электрофореза с помощью УФ-трансиллюминатора. Праймеры, условия ПЦР, рестрикционные эндонуклеазы, подобранные в соответствии с рекомендациями Lopez-Cima et al., Arizono et al. и Chiu et al. [11–13], представлены в табл. 1, где также указаны продукты рестрикции, соответствующие гомозиготному и гетерозиготному состоянию полиморфных вариантов в сравнении с диким типом.

Для статистической обработки данных использован пакет стандартных программ Excel 2000 и Statistica 6. Различия в частотах тех или иных генотипов (аллелей), также как других альтернативных показателей, определяли по критерию χ^2 , тогда как различия по количественным признакам определяли по критерию *t* Стьюдента.

Таблица 1

Анализ полиморфизма генов репарации ДНК: условия амплификации, рестрикции и целевые продукты

Ген	Праймеры	Условия ПЦР	Рестриктаза	Продукты рестрикции (п.о.)
<i>XPD</i> Asp312Asn rs1799793	(F) 5'- CTG TTG GTG GGT GCC CGT ATC TGT TGG TCT -3'	34 цикла: 94 °C – 30 с, 64 °C – 30 с, 74 °C – 60 с	StyI	Asp/Asp: 507+244; Asp/Asn: 507+474+244+33; Asn/Asn: 474+244+33.
	(R) 5'- TAA TAT CGG GGC TCA CCC TGC AGC ACT TCC T -3'			
<i>XRCC1</i> Arg399Gln rs25487	(F) 5'- GGA CTG TCA CCG CAT GCG TCG G -3'	33 цикла: 94 °C – 40 с, 62 °C – 40 с, 72 °C – 30 с	MspI	Arg/Arg: 115+34; Arg/Gln: 149+115+34; Gln/Gln: 149.
	(R) 5'- GGC TGG GAC CAC CTG TGT T -3'			

Продолжение табл. 1

Ген	Праймеры	Условия ПЦР	Рестриктаза	Продукты рестрикции (п.о.)
OGGI Ser326Cys rs1052133	F) 5'- CTG TTC AGT GCC GAC CTG CGC CGA -3'	32 цикла: 94 °C – 40 с, 60 °C – 40 с, 72 °C – 30 с	MboI	Ser/Ser: 224+23; Ser/Cys: 247+224+23; Cys/Cys: 247.
	(R) 5'- ATC TTG TTG TGC AAA CTG AC -3'			
ERCC6 Met1097Val rs2228526	F) 5'- CCT GCT T CT AAC ATA TCT GT -3'	35 циклов: 94 °C – 30 с, 55 °C – 30 с, 72 °C – 30 с	Nla III	Met/Met: 123+78; Met/Val: 201+123+78; Val/Val: 201
	(R) 5'- AAT CAC TGA CAA CTC TTC TG -3'			

Результаты и обсуждение

Характеристика группы пациентов с гистологически установленным РМП. В ходе проспективного исследования отобрано 336 пациентов с гистологически верифици-

рованным диагнозом рака мочевого пузыря (РМП). Состав группы представлен в табл. 2, а клинико-морфологические параметры опухоли – в табл. 3.

Таблица 2

Характеристика группы обследования

Признак	Пациенты с РМП (n = 336)	
	Количество человек	Частота, %
Пол		
Мужской	275	81,9
Женский	61	18,1
Возраст (лет)		
Минимальный	31	
Максимальный	88	
31–50	25	7,4
51–60	63	18,8
61–70	99	29,5
71–80	121	36,0
81–94	28	8,3
Средний возраст (m ± SD), лет	67,0 ± 10,7	
Медианный возраст, лет	68	
Курение		
Да	231	68,8
Нет	97	28,9
Нет данных	8	2,3

Примечание. m ± SD – среднее значение ± стандартное отклонение

Распределение пациентов с РМП по полу, возрасту и статусу курения показало, что мужчины составляли подавляющее большинство (82% выборки), средний возраст – 67 лет (медианный возраст – 68 лет); наиболее представительная возрастная группа – от 51 до 80 лет (85%). Среди пациентов с РМП 69% курит, что более чем в 2 раза превышает долю курильщиков среди здорового населения Беларуси [14].

Исследование достаточно большой выборки пациентов свидетельствовало о том, что болезнь чаще всего поражает мужчин, людей пожилого возраста и ассоциирована с курением, что соответствовало известным из литературы закономерностям [15, 16]. Результаты анализа также согласовывались с данными статистики злокачественных новообразований мочевого пузыря в Беларуси [17].

У 71% обследованных пациентов выявлены первичные опухоли, в 28% случаев – рецидивы РМП (1% – недифференцированный РМП). Хотя тенденция к преобладанию мультифокальных новообразований сохранялась как среди первичных, так и рецидивных опухолей, их соотношение различалось в пользу более высокой частоты множественных опухолей при

рецидивах РМП по сравнению с первичными опухолями. И в том, и другом случае частота папиллярных опухолей существенно превышала частоту солидных. Следовательно, наиболее типичны мультифокальные папиллярные опухоли, при этом частота множественных опухолей при рецидивах РМП была существенно выше, чем среди первичных опухолей.

Таблица 3

Клиническая характеристика опухолей

Опухоли		Единичные		Множественные		Папиллярные		Солидные	
Всего	%	Всего	%	Всего	%	Всего	%	Всего	%
Первичные									
240	71,4	102	42,9	137	57,6	199	83,6**	39	16,4
Рецидивные									
93	27,7	24	26,1	68	73,9*	82	90,1**	9	9,9

* – статистически значимые различия между частотами единичных и множественных опухолей при рецидивах РМП ($p = 0,005$);

** – статистически значимые различия между частотами папиллярных и солидных образований при $p < 0,0001$.

Одним из исследованных клинико-морфологических параметров являлся размер опухоли. Его сравнение со стадией заболевания, определяемой гистологически по степени распространения опухоли в близлежащие ткани, выявило вполне ожидаемые корреляции (табл. 4). Среди всех исследованных опухолей «плоские карциномы» (CIS) встречались крайне редко. Опухоли до 1 см относились к стадии Та (неинвазивная папиллярная карцинома) и Т1 (опухоль, распространяющаяся на субэпителиальную соединительную ткань), которые суммарно составляли почти 90%.

Опухоли до 1 см относились к стадии Та (неинвазивная папиллярная карцинома) и Т1 (опухоль, распространяющаяся на субэпителиальную соединительную ткань), которые суммарно составляли почти 90%.

Таблица 4

Степень распространения опухолей в сравнении с их размером

Размер, см / Стадия	0,3–1		1,1–3		3,1–5		>5	
	Всего	%	Всего	%	Всего	%	Всего	%
Та	18	37,5	24	18,3	3	3,6	0	0
TIS (CIS)	1	2,1	1	0,8				
T1	25	52,1	92	70,2	37	44,6	15	31,9
T2	3	6,3	12	9,2	29	34,9	10	21,3
T3	1	2,1	1	0,8	6	7,2	14	29,8
T4	0	0	1	0,8	8	9,6	8	17,0
Всего	48		131		83		47	

Примечание. Различия между частотами опухолей указанных размеров для каждой стадии Т статистически значимы ($p < 0,001$).

Опухоли от 1,1 до 3 см также относились преимущественно к стадиям Та и Т1, однако последняя значительно превалировала (70%). Опухоли от 3,1 до 5 см в 80% случаев определялись как Т1 или Т2 с инвазией в мышечный слой. Кроме того, 7% и почти 10%

опухолей этого размера составляли новообразования, распространяющиеся на паравезикальную клетчатку (Т3) и близлежащие органы и ткани (Т4). Среди опухолей более 5 см не встречались новообразования в стадии Та, примерно равное положение (от 21 до 32%) за-

нимали опухоли T1, T2, T3 и 17% относились к T4. То есть с увеличением своего размера опухоли распространялись на более глубокие слои стенки мочевого пузыря и подлежащие ткани с прорастанием в другие органы малого таза.

Для выбора методов лечения РМП и повышения его эффективности важны сроки постановки диагноза, стадия заболевания и степень дифференцировки опухоли. Степень дифференцировки уротелиальной карциномы мочевого пузыря без инвазии в мышечный слой определялась в соответствии с классификацией ВОЗ 1973 г. Выделяли:

- высокодифференцированный уротелиальный рак – G1;
- умеренно-дифференцированный уротелиальный рак – G2;
- низкодифференцированный рак – G3 [5].

В соответствии с новой классификацией ВОЗ, опубликованной в 2004 г., среди уротелиальных папиллярных новообразований различают:

- папиллярные опухоли уротелия с низким злокачественным потенциалом (PUNLMP);
- папиллярный уротелиальный рак низкой степени злокачественности (low grade);
- папиллярный уротелиальный рак высокой степени злокачественности (high grade) [5].

Классификации 1973 и 2004 гг. подтвердили свою прогностическую ценность, и в настоящее время обе имеют силу. Поэтому при гистологических и цитологических исследованиях степень дифференцировки опухолевой ткани (Grade) дополнялась степенью ее злокачественности (“low” и “high”).

Анализ первичных опухолей показал следующее (табл. 5). Первичные случаи РМП диагностировались в основном на стадии T1 (56,5%), тогда как опухоли на предпочтительной для последующего благоприятного прогноза стадии Ta составляли всего 12%.

Опухоли с инвазией в мышечный слой (T2) встречались с частотой 17%, а распространяющиеся на паравезикальную клетчатку (T3) и близлежащие органы и ткани (T4) вместе составляли 14%. По степени дифференцировки опухолевой ткани 33% относились к высоко дифференцированным карциномам с низкой степенью злокачественности, 46% – к умеренно-дифференцированным карциномам, среди которых выявлено 59% с низкой и 41% с высокой степенью злокачественности, и 21% относились к низкодифференцированному раку с высокой степенью злокачественности.

Отсюда следует, что стадия Ta остается недостаточно уловимой для ранней диагностики. Стадия T1 устанавливается более чем в половине случаев и вместе со стадиями Ta и T2 составляет 86%, что полностью соответствует частоте диагнозов в I–II стадии заболевания (84,5%) относительно вновь выявленных случаев РМП в Беларуси в 2012 г. [17].

Согласно данным европейских и американских урологов, большинство опухолей мочевого пузыря (70–80%) на момент постановки диагноза являются поверхностными высокодифференцированными (Ta/T1G1) [18]. Мышечно-инвазивный РМП (T2) регистрируется у 25% пациентов, которые обычно подвергаются цистэктомии. Большинство инвазивных опухолей проявляют высокую склонность к метастазированию. Наше исследование показывает, что РМП Ta/T1 среди первично выявляемых опухолей составил 67,6%, что приближается к уровню диагностики за рубежом. Мышечно-инвазивный рак (T2) диагностировался с меньшей частотой (17%), но достаточно большая доля (14%) приходилась на опухоли T3/T4, распространяющиеся на паравезикальную клетчатку и прилежащие органы малого таза.

Таблица 5

Характеристика первичных опухолей по степени дифференцировки и злокачественности

Стадия РМП	Всего	%	Степень дифференцировки	Всего	%	Степень злокачественности	Всего	%
Ta	29	12,1	G1	78	33,0	low	142	60,2
T1	135	56,5	G2	108	45,8	high	94	39,8
T2	41	17,2	G3	50	21,2			
T3	19	7,9						
T4	15	6,3						

Таким образом, проблема ранней диагностики РМП остается актуальной, от ее успешного решения зависит прогноз течения заболевания, выбор тактики и эффективность лечения. Второй по значимости проблемой является поиск дополнительных факторов, способствующих уточнению индивидуального прогноза, и в этом отношении определенный интерес представляет полиморфизм генов репарации ДНК, так как гипотетически полиморфные варианты этих генов могут

модифицировать индивидуальную чувствительность не только к возникновению, но и прогрессированию рака.

Анализ полиморфизма генов репарации ДНК XPD, XRCC1, OGG1 и ERCC6 в зависимости от степени распространения и дифференцировки опухоли. Подробная характеристика генов и изученных полиморфных вариантов дана в предыдущих публикациях [19, 20]. Результаты генотипирования в зависимости от стадии T представлены в табл. 6.

Таблица 6

Распределение генотипов и частота минорного аллеля по изученным генам эксцизионной репарации ДНК

Генотипы/аллели	Частота генотипов/аллелей, %					
	Ta	T1	T2	T3	T4	T3-4
XPD 312 rs1799793	n = 53	n = 180	n = 56	n = 23	n = 17	n = 40
Asp/Asp	22,64	33,33	34,48	26,09	5,88	17,5
Asp/Asn	64,15	51,11	48,28	47,83	70,59	57,5
Asn/Asn	13,21	15,56	17,24	26,09	23,53	25
Asn/Asn+Asp/Asn	77,36	66,67*	65,52	73,91	94,12*	82,5
Asn	45,28	41,11*	41,38	50	58,82*	53,75
XRCC1 399 rs25487	n = 52	n = 180	n = 56	n = 23	n = 17	n = 40
Arg/Arg	44,23	40,56	34,48	60,87	52,94	57,5
Arg/Gln	50	45,56	51,72	39,13	41,18	40
Gln/Gln	5,77	13,89	13,79	0	5,88	2,5
Gln/Gln+Arg/Gln	55,77	59,44	65,52	39,13	47,06	42,5
Gln	30,77	36,67	39,66	19,57	26,47	22,5
OGG1 326 rs1052133	n = 54	n = 181	n = 56	n = 23	n = 17	n = 40
Ser/Ser	79,63	62,98	67,24	65,22	64,71	65
Ser/Cys	18,52	30,39	27,59	26,09	35,29	30
Cys/Cys	1,86	6,63	5,17	8,7	0	5
Cys/Cys+Ser/Cys	20,37	37,02	32,76	34,78	35,29	35
Cys	11,11	21,82	18,97	21,74	17,65	20
ERCC6 1097 rs2228526	n = 54	n = 182	n = 58	n = 23	n = 17	n = 40
Met/Met	61,11	45,60	56,9	47,83	41,18	45
Met/Val	31,48	48,90	31,03	43,48	52,94	47,5
Val/Val	7,41	5,4945	12,07	8,7	5,88	7,5
Val/Val+Met/Val	38,89	54,4	43,10	52,17	58,82	55
Val	23,15	29,95	27,59	30,43	32,35	31,25

* – существенные различия между T1 и T4 по частотам суммы генотипов Asn/Asn+Asp/Asn ($p = 0,019$) и минорного аллеля гена XPD ($p = 0,019$ и $p = 0,048$, соответственно).

В общей выборке пациентов обнаружена тенденция к повышению частоты полиморфных вариантов генов XPD (кодон 312, rs1799793), OGG1 (кодон 326, rs1052133) и ERCC6 (кодон 1097, rs2228526) по мере увеличения степени

распространения опухоли. Наблюдались статистически значимые различия между T1 и T4 по частотам встречаемости суммы генотипов Asn/Asn+Asp/Asn и полиморфного аллеля Asn гена XPD. Значительные различия между Ta и

T4 для гомозиготного генотипа Cys/Cys и варианта Cys гена *OGGI*, так же как и для суммы генотипов Val/Val+Met/Val и варианта Val гена *ERCC6* не доказаны статистически. Тем не менее, отдельный анализ выборок первичных и рецидивных опухолей позволил выявить некоторые особенности (см. рис. 1).

У пациентов с первичными опухолями частоты генотипов Asn/Asn+Asp/Asn и полиморфного аллеля *XPD312Asn* существенно повышались при прогрессировании опухоли, особенно при ее распространении на другие органы малого таза (T4). У пациентов с рецидивными опухолями эта тенденция сохранялась, но различия не были статистически значимыми. Наоборот, у пациентов с рецидивами РМП наблюдалось статистически значимое уменьшение частоты гомозиготного дикого генотипа (Ser/Ser) гена *OGGI* ($p = 0,014$) и противоположная зависимость для суммы генотипов, гетерозиготных и гомозиготных по минорному аллелю *OGGI 326Cys* ($p = 0,0008$). Частота минорного аллеля этого гена при инвазии в перевизикальную клетчатку и распространении на близлежащие органы и ткани (T3/T4) возрастала до 42%, тогда как при стадии Ta составляла лишь 2,5% ($p = 0,008$).

Анализ результатов генотипирования в подгруппах пациентов с различной степенью дифференцировки (G) и злокачественности (low/high) опухолей не выявил какие-либо различия между частотами генотипов/аллелей по изученным генам репарации ДНК в зависимости от этих клинико-морфологических характеристик.

Следовательно, у носителей полиморфных аллелей *XPD 312Asn* или *OGGI 326Cys* увеличивается вероятность прогрессии опухоли, однако модифицирующий эффект функциональной недостаточности гена *XPD* в большей степени проявляется при первичных опухолях, тогда как гена *OGGI* – при рецидивах РМП. Полиморфизм этих и других изученных генов репарации ДНК не оказывает явного влияния на злокачественный потенциал опухоли.

В отличие от большого количества публикаций, посвященных изучению ассоциаций между полиморфизмом различных генов репарации ДНК и риском развития рака, включая и данные относительно РМП [10, 21], возможное влияние полиморфных вариантов этих генов на прогрессирование опухоли исследовано мало. В одной из таких пионерских работ авторы показали, что, несмотря на отсутствие эффекта изученных ими полиморфных вариантов пяти генов эксцизионной репарации ДНК (*XPD*, *XPC*, *XPG*, *XRCC1* и *XRCC3*) на восприимчивость к раку, некоторые из них ассоциированы с клинико-морфологическими параметрами ренальной карциномы, особенно у курящих пациентов [22]. Японскими учеными установлена также прогностическая значимость комбинированных генотипов, содержащих полиморфные аллели генов *XPD* и *XRCC1*, у пациентов с мышечно-инвазивным РМП при лечении препаратами платины [23]. Затронутая проблема далека от своего разрешения, так как исследования в этой области находятся в стадии накопления данных.

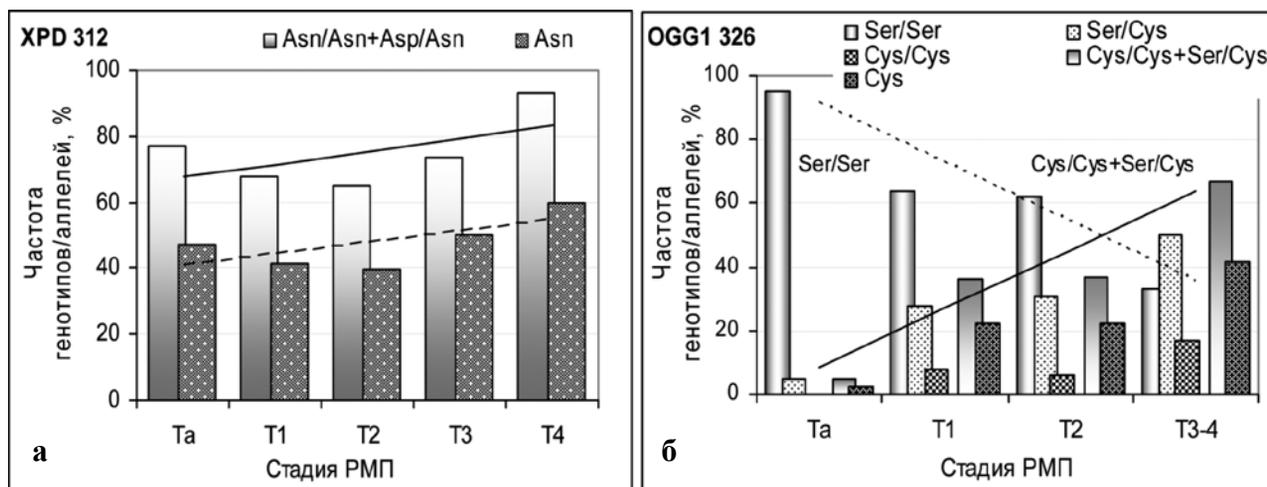


Рис. 1. Распределение генотипов/аллелей по генам *XPD 312* и *OGGI 326* в группе пациентов с: а) первичными и б) рецидивными опухолями

Заключение

Генотипировано 336 образцов ДНК от пациентов с гистологически установленным раком мочевого пузыря (РМП) и проанализировано распределение частот генотипов и аллелей генов эксцизионной репарации *XPB* Asp312Asn, *XRCC1* Arg399Gln, *OGG1* Ser326Cys и *ERCC6* Met1097Val в зависимости от клинико-морфологических параметров опухоли. Распределение пациентов с РМП по полу, возрасту и статусу курения подтвердило зависимость заболевания от этих показателей. У 71% пациентов диагностированы первичные опухоли, в 28% случаев наблюдались рецидивы. Среди опухолей преобладали мультифокальные папиллярные новообразования, частота которых при рецидивах существенно превышала их частоту при первичном раке. Опухоли в основном диагностировались на стадии Та/Т1, однако распространение на паравезикальную клетчатку (Т3) и прорастание в близлежащие органы малого таза (Т4) отмечены в 14% первичных случаев РМП. Размер опухоли коррелировал со степенью ее распространения (Т). Среди первичных опухолей 33% относились к высоко дифференцированным карциномам (G1), 46% – к умеренно дифференцированным (G2) и 21% – к низко дифференцированным опухолям (G3), что соответствовало 60% опухолей с низкой и 40% – с высокой степенью злокачественности.

Анализ распределения частот генотипов и аллелей изученных генов эксцизионной репарации ДНК в зависимости от клинико-морфологических параметров опухоли выявил тенденцию к повышению частоты полиморфных вариантов генов *XPB* (кодон 312), *OGG1* (кодон 326) и *ERCC6* (кодон 1097) по мере увеличения степени распространения опухоли. Однако статистически значимые различия между стадиями Та-Т1 и Т4 установлены только для носителей генотипов Asn/Asn+Asp/Asn ($p=0,019$) и полиморфного аллеля Asn гена *XPB* ($p=0,048$), а также носителей генотипов Cys/Cys+Ser/Cys ($p=0,0008$) и минорного аллеля Cys гена *OGG1* ($p=0,008$) при рецидивах рака. Не выявлена ассоциация между частотами генотипов/аллелей и степенью дифференцировки и/или злокачественности опухоли.

Таким образом, на проспективной когорте пациентов показана ассоциация полиморфных вариантов генов эксцизионной репарации

ДНК *XPB* (rs1799793) и *OGG1* (rs1052133) со степенью распространения опухоли, что может указывать на их потенциальную способность модифицировать прогрессирование болезни. Чтобы сделать окончательные выводы и оценить целесообразность использования подобных молекулярно-генетических маркеров для уточнения прогноза клинического течения РМП, необходимо продолжить исследования.

Список источников

1. Global cancer statistics, 2002 / D.M. Parkin [et al.] // *CA Cancer J. Clin.* – 2005. – Vol. 55, No. 2. – P.74–108.
2. Корнеев, И.А. Значение факторов прогноза для выбора метода лечения больных с карциномами уротелия [Электронный ресурс] / И.А. Корнеев, Ю.А. Суханов // *UroWeb.ru*, 2002–2014, Урологические ведомости. – 2012. – № 1. – Режим доступа: <http://uroweb.ru/db/article/znachenie-faktorov-prognoza-dlya-vybora-metoda-lecheniya-bolnykh-s-kartsinomami-uroteliya>.
3. Knowles, M.A. Novel therapeutic targets in bladder cancer: mutation and expression of FGF receptors / M.A. Knowles // *Future Oncol.* – 2008. – Vol. 4, № 1. – P. 71–83.
4. Злокачественные новообразования в Беларуси, 2001–2010 / С.М. Поляков [и др.]; под ред. М.М. Сачек, О.Г. Суконко. – Минск: РНПЦ МТ, 2011. – 205 с.
5. Рак мочевого пузыря ТаТ1 (без мышечной инвазии) / М. Babjuk [et al.]; пер. М.Ю. Федянин, научн. ред. О.Б. Карякин // Европейская ассоциация урологов. – 2010. – С. 1–20.
6. Инвазивный и метастатический рак мочевого пузыря / А. Stenzl [et al.]; пер. О.В. Антонов, научн. ред. И.Г. Русаков // Европейская ассоциация урологов. – 2010. – С. 1–63.
7. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials / R.J. Sylvester [et al.] // *Eur Urol.* – 2006. – Vol. 49, № 3. – P. 466–477.
8. Ather, M.H. Predicting recurrence and progression in non-muscle-invasive bladder cancer using European organization of research and treatment of cancer risk tables / M.H. Ather, M. Zaidi // *Urol. J.* – 2009. – Vol. 6, № 3. – P. 189–193.

9. Primary superficial bladder cancer risk groups according to progression, mortality and recurrence / F. Millán-Rodríguez [et al.] // *J. Urol.* – 2000. – Vol. 164 (3 Pt 1). – P. 680–684.
10. Полиморфизмы генов эксцизионной репарации ДНК при раке мочевого пузыря / Н.В. Савина [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. – Минск, 2011. – Т. 12. – С. 64–74.
11. Polymorphisms in *XPC*, *XPB*, *XRCC1*, and *XRCC3* DNA repair genes and lung cancer risk in a population of northern Spain / M.F. Lopez-Cima [et al.] // *BMC Cancer.* – 2007. – Vol. 7. – P. 162.
12. Arizono, K. DNA repair gene *hOGG1* codon 326 and *XRCC1* codon 399 polymorphisms and bladder cancer risk in a Japanese population / K. Arizono, Y. Osada, Y. Kuroda // *Jpn. J. Clin. Oncol.* – 2008. – Vol. 38, № 3. – P. 186–191.
13. A novel single nucleotide polymorphism in *ERCC6* gene is associated with oral cancer susceptibility in Taiwanese patients / C.F. Chiu [et al.] // *Oral Oncol.* – 2008. – Vol. 44, № 6. – P. 582–586.
14. Распределение полиморфных вариантов генов эксцизионной репарации *XPB*, *XRCC1*, *hOGG1* у взрослого населения Беларуси / Н.В. Никитченко [и др.] // *Весті НАН Беларусі. Сер. мед. навук.* – 2013. – № 2. – С. 4–9.
15. Janković, S. Risk factors for bladder cancer / S. Janković, V. Radosavljević // *Tumori.* – 2007. – Vol. 93. – P. 4–12.
16. Gene polymorphisms in bladder cancer / M. Franekova [et al.] // *Urologic Oncology.* – 2008. – Vol. 26. – P. 1–8.
17. Океанов, А.Е. Статистика онкологических заболеваний / А.Е. Океанов, П.И. Моисеев, Л.Ф. Левин; под ред. О.Г. Суконко. – Минск, 2013. – 373 с.
18. The development of multiple bladder tumour recurrences in relation to the *FGFR3* mutation status of the primary tumour / L.C. Kompier [et al.] // *J. Pathol.* – 2009. – Vol. 218, № 1. – P. 104–112.
19. Полиморфизм генов эксцизионной репарации *XPB*, *XRCC1* и *hOGG1* у населения Республики Беларусь и его влияние на канцерогенез / О.П. Романюк [и др.] // *Экологическая генетика.* – 2013. – Т. 11, № 4. – С. 45–63.
20. Связь полиморфизма генов репарации ДНК *XPB*, *XRCC1*, *OGG1*, *ERCC6* с продолжительностью жизни и склонностью к курению / О.П. Романюк [и др.] // *Генетика.* – 2014. – Т. 50, № 8. – С. 1–11.
21. Goode, E.L. Polymorphisms in DNA repair genes and association with cancer risk / E.L. Goode, C.M. Urich, J.D. Potter // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2002. – Vol. 11. – P. 1513–1530.
22. The association of DNA repair gene polymorphisms with the development and progression of renal cell carcinoma / S. Sakano [et al.] // *Ann. Oncol.* – 2007. – Vol. 18, № 11. – P. 1817–1827.
23. Single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes might be prognostic factors in muscle-invasive bladder cancer patients treated with chemoradiotherapy / S. Sakano [et al.] // *Br. J. Cancer.* – 2006. – Vol. 95, № 5. – P. 561–570.

Дата поступления статьи 24 сентября 2014 г.

МИКРОЭВОЛЮЦИОННАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПОЛИПЛОИДНЫХ ВИДОВ ЗЛАКОВ ПУТЕМ ФОРМИРОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ГЕНОМОВ

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220027, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Открытие универсальности феномена геномных дупликаций в эволюции живых систем явилось одним из важнейших достижений геномной эры, возобновившим интерес к полиплоидии. В ходе многочисленных исследований, выполненных с применением молекулярных технологий, было установлено, что генезис аллополиплоидных форм сопровождается кардинальными геномными преобразованиями и модификациями [1–4]. Часть этих изменений возникает на ранних стадиях формирования аллополиплоида, обеспечивая цитологическую и генетическую диплоидизацию гибридной формы. Другие изменения появляются спорадически на протяжении длительного периода микроэволюционной дифференциации полиплоидных видов, и именно они ответственны за высокую пластичность генома полиплоидов в целом и злаков в частности и вследствие этого представляют наибольший интерес для практической селекции.

Специфика этих изменений определяется тем, что объединение в одном ядре разных геномов открывает возможность обмена между ними генетическим материалом, что существенно расширяет спектр изменчивости полиплоидных форм. Дальнейший и, пожалуй, наиболее значимый вклад в расширение этого спектра вносят гибридизационные процессы. Этому в первую очередь способствует свойство полиплоидии повышать скрещиваемость между видами [5], во-вторых, тот факт, что многие полиплоидные виды злаков произрастают в симпатрических популяциях, насчитывающих несколько видов с численным преобладанием одного из них [6].

Легче всего, как было установлено, скрещиваются тетраплоидные амфидиплоиды, имеющие в своем составе один общий геном [7]. Отличительной особенностью образующих-

ся при этом амфидиплоидов второго порядка является очень широкий диапазон изменчивости, возникающей за счет комбинаторики генетического материала гаплоидных дифференцированных геномов и формирования на их основе многочисленных вариантов нового рекомбинантного генома.

Учитывая возросшую в последнее время потребность в обновлении генофонда зерновых культур, представляется перспективным использовать этот апробированный природой прием для качественного изменения спектра доступной отбору генотипической изменчивости культурных злаков. В связи с этим особое значение приобретает знание закономерностей и механизмов формирования рекомбинантных геномов. Выяснение ключевых моментов процесса стабилизации рекомбинантных геномов злаков с одной стороны создает основу для разработки более эффективных методов обогащения генофонда зерновых культур, с другой – расширяет наши представления о путях микроэволюционной дивергенции представителей семейства *Poaceae*. Исходя из вышеизложенного, мы поставили перед собой цель воспроизвести в эксперименте процесс микроэволюционной дифференциации полиплоидных видов злаков путем формирования рекомбинантных геномов, выявить закономерности и механизмы образования межгеномных рекомбинаций и на их основе разработать новые эффективные методы расширения генетической изменчивости злаковых культур. В данной статье представлены основные результаты работ в этом направлении.

Материалы и методы

Модельной системой для исследования процесса стабилизации рекомбинантных геномов злаков служили тетраплоидные пшенично-ржаные амфидиплоиды (тритикале). Гибри-

ды F_1 этих форм содержат в кариотипе диплоидный набор хромосом ржи и гаплоидные наборы хромосом А- и В-геномов пшеницы (ABRR). В последующих поколениях тетраформ в каждой гомеологичной группе пшеничного компонента кариотипа происходит замещение одного из гомологов на соответствующий гомолог. В результате формируется рекомбинантный геном, составленный разными сочетаниями пар хромосом А- и В-геномов пшеницы, причем теоретически возможны 128 таких сочетаний.

В эксперимент были включены три формы тетраплоидных тритикале ПРАТ 12, ПРАТ 16 и ПРАТ 72, полученные в результате гибридизации гексаплоидных тритикале с диплоидной аллоплазматической рожью [8]. Каждая из 3-х форм представляет собой потомство гибрида F_2 , репродуцируемое в условиях свободного опыления. Анализ хромосомного состава растений в ряду поколений (F_6 , F_{10} , F_{14} – F_{17}) выполнялся с помощью метода дифференциального окрашивания хромосом по Гимза [9].

Результаты и обсуждение

Первый анализ хромосомного состава, проведенный в F_6 гибридов, показал, что каждая из трех форм представляет собой популяцию растений с различными вариантами кариотипа. В каждом варианте геном ржи был представлен полностью, а пшеничный компонент образован определенным сочетанием хромосом А- и В-геномов. Всего в исследованном материале было выявлено 30 вариантов таких сочетаний, различия между которыми были

обусловлены главным образом разными сочетаниями хромосом А- и В-геномов во 2, 3 и 7-й гомеологичных группах, в то время как состав остальных групп практически полностью стабилизировался (рис. 1).

Поскольку первоначально предполагалось, что конечным этапом стабилизации хромосомного состава тетраплоидных тритикале является подбор пар гомологов во всех гомеологичных группах пшеничного компонента кариотипа, на основании полученных данных был сделан вывод о незавершенности процесса стабилизации кариотипа исследованных форм. Полагая, однако, что растения с гетерологичными парами хромосом как менее жизнеспособные будут подвержены элиминации из популяций, мы ожидали скорого его завершения в одном из следующих поколений.

Повторный хромосомный анализ популяций был выполнен на материале F_{10} . Вопреки нашим ожиданиям в исследованном материале по-прежнему наблюдались растения с нестабильным кариотипом, количество которых составило 48,9%. Аналогичная картина была обнаружена и в последующих поколениях (F_{14} – F_{17}) тетраформ (рис. 2). Сохранение в отдельных группах гетерологичных пар хромосом существенным образом расширяло спектр генетической изменчивости гибридного материала.

При сопоставлении результатов кариотипирования различных поколений тетраформ было установлено, что в пределах популяций F_6 и F_{10} одинаковые варианты кариотипа составляют лишь 31,2% от общего числа выявлен-

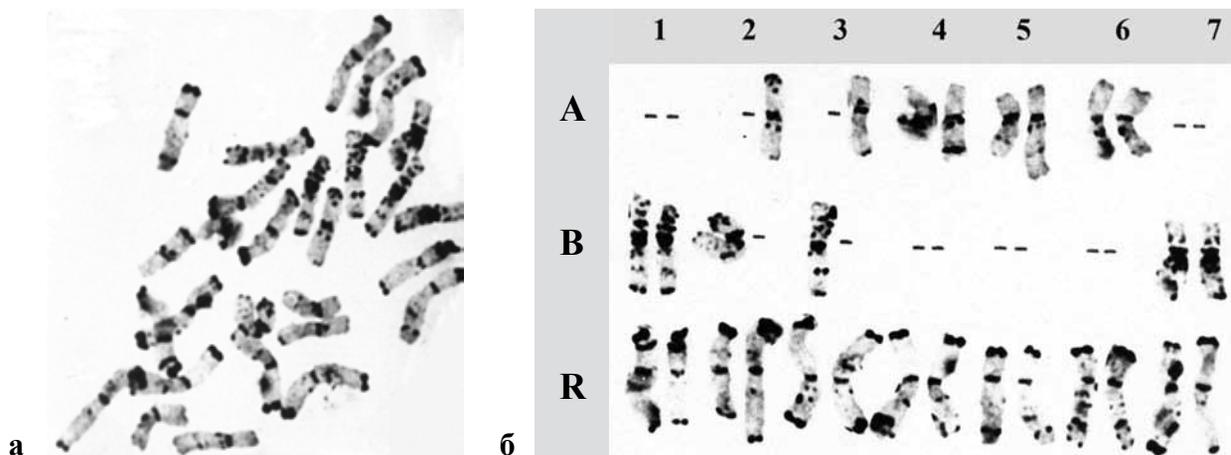


Рис. 1. Метафазная пластинка и раскладка по геномам и гомеологичным группам митотических хромосом тетраплоидного тритикале F_6

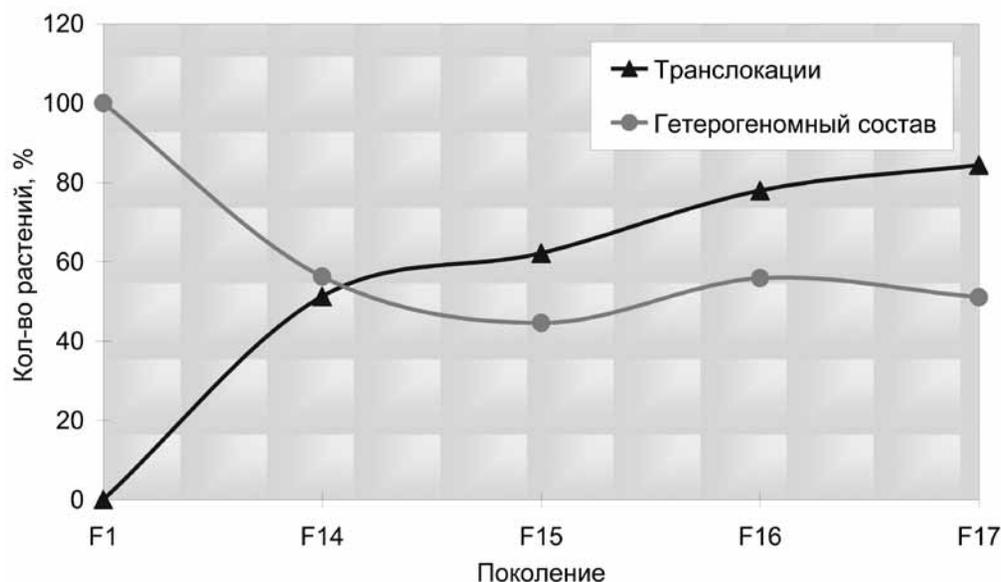
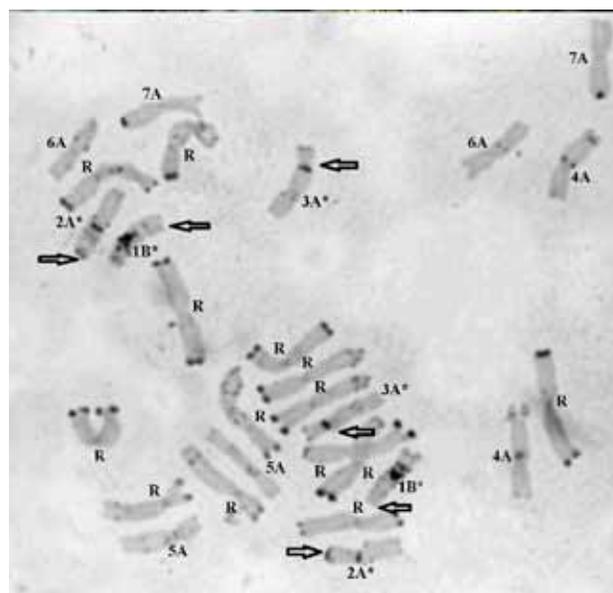


Рис. 2. Динамика изменения в популяциях 4х-тритикале количества растений с гетерогеномным составом гомеологических групп и наличием хромосомных aberrаций

ных; для популяций F_{10} и F_{14} этот показатель равен 37,0%; для F_{14} и F_{15} – 30,2%; для F_{15} и F_{16} – 26,7% и для F_{16} и F_{17} – 33,8%, то есть между поколениями наблюдаются существенные различия по хромосомному составу. Особенно ярко эти различия проявляются при сопоставлении гибридов F_6 и F_{17} – в данном случае общими являются лишь 20,6% вариантов. На основании этих данных можно сделать вывод, что в ходе смены поколений тетраплоидных тритикале происходит постоянное перераспределение генетического материала А- и В-геномов пшеницы и дальнейшее расширение спектра генотипической изменчивости гибридного материала.

Другой особенностью процесса формирования кариотипа тетраформ является появление хромосом пшеницы с модифицированной структурой. Если в ранних поколениях гибридов наблюдались единичные растения с модифицированными хромосомами, то в F_{14} каждое второе растение характеризовалось наличием того или иного типа хромосомных aberrаций, а в ряде случаев и нескольких типов (рис. 3). Это побудило нас в дальнейшем вести детальный учет всех возникающих в популяциях 4х-тритикале хромосомных aberrаций. При этом выяснилось, что модификациям подвергаются хромосомы лишь тех гомеологических групп, для которых характерно сохранение

гетерогеномного состава. Если сопоставить это наблюдение с характером структурных изменений, то становится очевидным, что эти изменения представляют собой реципрокные транслокации, образовавшиеся в ходе спаривания гомеологических хромосом А- и В-геномов пшеницы.



Стрелками обозначены места локализации транслоцированных сегментов на aberrантных хромосомах

Рис. 3. Кариотип растения с парами транслоцированных хромосом 1BS.1BL-1AL, 2BS-2AS.2AL и 3AS.3AL-3BL

Факт спаривания гомеологов пшеницы в мейозе 4х-тритикале был подтвержден экспериментально в ходе анализа микроспорогенеза с использованием метода С-бэндинга (рис. 4).

Что касается причины столь высокого уровня спаривания гомеологичных хромосом пшеницы у АВRR-гибридов, то она кроется в полном подавлении экспрессии *Ph1*-гена, что обеспечивается как влиянием генома ржи, содержащего несколько аллелей, блокирующих активность *Ph1*-гена, так и моносомным состоянием хромосомы 5В.

Следует, однако, подчеркнуть, что отсутствие активности *Ph1*-гена хотя и является необходимым условием для спаривания гомеологичных хромосом, но не гарантирует последующего образования между ними рекомбинаций [10]. В связи с этим процесс формирования кариотипа тетраплоидных тритикале представляет особый интерес. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что у этих пшенично-ржаных гибридов спаривание гомеологичных хромосом пшеницы, как правило, сопровождается образованием кроссоверных обменов, причем эти обмены происходят между хромосомами А- и В-геномов, которые, по литературным данным, ассоциаций в мейозе не образуют. Данный феномен, на наш взгляд, связан с доминирующей ролью регуляторных генетических систем базового генома ржи. Экспериментально доказанный нами факт подавления экспрессии гена *Ph1* наглядно демонстрирует эту роль, которая явно не ограничивается процессом спаривания хромосом, а распространяется на всю программу мейотического цикла, включая кроссинговер. Как следствие этого у гибридов F_1 синхронно гомеологичных хромосом А- и В-геномов пшеницы сопровождается образованием кроссоверных обменов.

Здесь важно отметить, что формирование рекомбинантного генома тетраплоидных тритикале за счет межгеномных рекомбинаций не только на уровне целых хромосом, но и на уровне их сегментов, существенным образом повышает генетическую дифференциацию гибридного материала. Так, в популяции ПРАТ 12 (F_{17}) в ходе хромосомного анализа было выявлено 22 варианта кариотипа, из которых шесть были отмечены у двух растений. Однако ни в одном из шести случаев эти

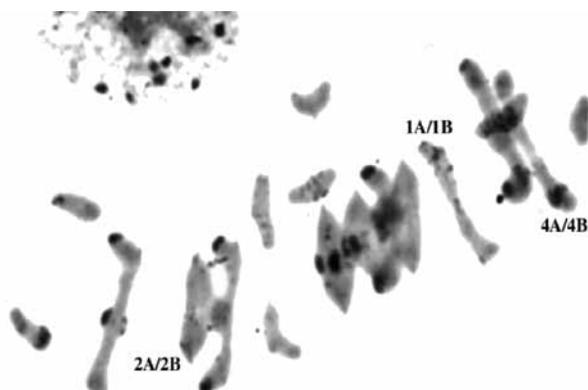


Рис. 4. Метафаза I мейоза гибридов АВRR

два растения не были идентичны друг другу вследствие наличия разных типов хромосомных aberrаций, то есть все они принадлежали к разным цитотипам. Если учесть при этом, что метод С-бэндинга позволил нам выявить в популяциях лишь часть структурных преобразований хромосом без учета размеров транслоцированных сегментов, которые у разных растений могут в значительной степени варьировать [11], то истинное количество цитотипов в данной популяции должно быть на порядок выше. Аналогичную ситуацию можно проследить и в других популяциях.

Таким образом, нами было установлено, что стабилизация кариотипа тетраплоидных тритикале по формальному признаку – наличию пар гомологов не наступает никогда. Возникает вполне закономерный вопрос: «Чем вызвано наблюдаемое на протяжении большого числа поколений тетраформ сохранение в их кариотипах гетерологичных пар хромосом?». Можно предположить, что растения с гетерогеномным составом групп образуются в каждом очередном поколении заново, как результат гибридизации особей, в кариотипах которых эти группы содержат пары хромосом из разных геномов пшеницы. Однако в таком случае, при исходном равенстве частот хромосом А- и В-геномов у гибридов F_1 , гетерологичные пары хромосом должны присутствовать во всех гомеологичных группах, и частота их образования должна быть сходной. Мы же этого не наблюдаем.

Возможно в ранних поколениях гибридов, когда эффективная численность популяций была низкой, произошли чисто случайные отклонения в соотношении частот генотипов, вызванные статистическими причинами, что и привело к быстрой стабилизации ряда групп

при сохранении гетерологичных пар в остальных. Но тогда не поддается объяснению факт сходства хромосомного состава 4, 5 и 6-й гомеологичных групп, которые в нашем материале не только быстро стабилизировались, но и все содержат пары гомологов А-гена. Вероятность случайного совпадения состава в трех группах у трех форм ($p = (1/2)^9$) очень мала. Из этого следует, что в ходе становления кариотипа 4х-тритикале как подбор пар гомологов в группах с высокой скоростью стабилизации, так и сохранение гетерогеномного состава остальных групп происходит не случайным образом.

Сопоставление результатов анализа поведения хромосом на стадии метафазы I мейоза у гибридов F_1 с результатами кариотипирования более поздних поколений свидетельствует о том, что существует корреляция между частотой спаривания гомеологичных хромосом и скоростью стабилизации соответствующей гомеологичной группы. Исходя из этого, напрашивается вывод, что именно синапсис гомологов замедляет процесс подбора пар гомологов. Но в таком случае необъясним факт различия по набору гомеологичных групп с гетерогеномным составом между тетраплоидными тритикале из разных селекционных программ. Известно, что частота спаривания хромосом определяется их структурным сходством, которое для гомологов различных субгеномов мягкой пшеницы является величиной постоянной, отражающей степень их эволюционной дивергенции. Поэтому сортовые различия включенного в гибридизацию исходного материала не могут столь существенно влиять на синапсис гомологов, чтобы обеспечить в гибридном материале различные наборы гетерологичных пар хромосом.

В итоге мы пришли к заключению, что в ходе стабилизации кариотипа тетраплоидных тритикале процесс взаимозамещения гомологов А- и В-геномов определяется их селективными преимуществами, которые, как известно, являются результатом генотип-средовых взаимодействий. Когда гомеолог обладает явными селективными преимуществами, подбор пары гомологов в соответствующей гомеологичной группе происходит довольно быстро. Когда же конкурентоспособность гомологов одинакова, скорость стабилизации группы замедляется. При этом доминирование генетических

систем базового генома ржи обеспечивает синапсис гомологов пшеницы с последующей рекомбинацией генетического материала.

Из этого следует, что в различных условиях среды отбор будет благоприятствовать сохранению в гибридном материале разных сочетаний хромосом А- и В-геномов пшеницы. Анализ собственных и литературных данных подтверждает эти ожидания. В нашем материале из 128 теоретически возможных стабильных вариантов кариотипа были обнаружены лишь 26, причем явное численное преимущество имели только два. В материале, проанализированном Lukaszewski et al. [12], предпочтительное сочетание хромосом А- и В-геномов выглядело иным образом, и частота встречаемости растений с таким кариотипом в 9 раз превышала теоретически ожидаемую. И, наконец, в материале дагестанской селекции явное численное преимущество имели выявленные у пяти форм из восьми три варианта кариотипа, различающиеся между собой лишь составом 2-й гомеологичной группы [13]. Все они были отличны от вариантов, преобладающих в материале других селекционных программ.

Но особенно яркой иллюстрацией справедливости выдвинутого нами положения является ситуация со спонтанной гибридизацией нашего материала с линией дагестанской селекции ПРАТ 21 (состав пшеничного компонента кариотипа: 1В 2А 3В 4В 5В 6А 7А), вызвавшая появление в 4 и 5-й гомеологичных группах нетипичных для популяций хромосом В-гена. Тот факт, что дальнейшая пространственная изоляция дагестанской линии способствовала быстрой элиминации из кариотипов популяций хромосом 4В и 5В, бесспорно свидетельствует о селективных преимуществах в наших условиях произрастания соответствующих гомологов А-гена.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в ходе эволюционного становления полиплоидных видов злаков гибридизация на основе базового генома одних и тех же первичных тетраплоидных форм в разных экологических нишах приводила к отбору различных вариантов формируемого рекомбинантного генома. Это способствовало быстрой микроэволюционной дифференциации гибридных форм и возникновению на их основе новых таксономических единиц.

На ранних этапах эволюции семейства *Poaceae* широкие возможности для такой гибридизации существовали в конце мелового периода, когда вследствие ухудшения обще-земных климатических условий злаки вместе с другими группами спускавшихся с гор покрытосеменных растений стали осваивать низкогорья и равнины, где появились свободные экологические ниши за счет вымирания более специализированных мезозойских растений [14]. Столкновение миграционных потоков приводило к образованию различных гибридных форм, на основе которых возникли сначала первичные аллотетраплоиды, а затем и вторичные гибридогенные таксоны, в том числе таксоны рекомбинантного типа. При этом логично предположить, что гибриды с рекомбинантными геномами, характеризующиеся максимальным размахом генетической изменчивости и, как следствие этого, высокой пластичностью и адаптивностью, обладали повышенной конкурентноспособностью при освоении новых территорий.

Важно подчеркнуть, что активные гибридизационные процессы в семействе *Poaceae* продолжаются и в настоящее время, причем, как свидетельствуют литературные данные, наибольших масштабов естественная гибридизация достигает на стыке флористических областей. В качестве примера можно привести агростофлору (злаковый компонент сосудистой флоры) Дальневосточного региона России, расположенного на границах сибирской, восточноазиатской, берингийской и арктической флор. Наличие здесь широко-масштабных процессов гибридизации было прослежено Н.С. Пробатовой в пределах родов *Poa* (особенно в секциях *Poa* и *Stenopoa*), *Agrostis* (секция *Trichodium*), *Alopecurus* (секция *Alopecurus*), *Elymus* (секция *Goulardia*), *Hierochloë*, *Puccinellia*, *Calamagrostis* и др. [15]. Автор отмечает, что большие возможности гибридизации в этих родах способствуют «сглаживанию» морфологических границ между многими видами и даже между секциями, вследствие чего гибридогенные виды бывает затруднительно отнести к той или иной группе родства. Примечательно также то, что большинство этих таксонов характеризуется широкой («веерной») экологической адаптацией, причем наиболее жизнеспособные и

экологически толерантные ценопопуляции, по свидетельству автора, наблюдаются у видов-тетраплоидов, что явно свидетельствует в пользу наличия у них рекомбинантных геномов.

К сожалению, среди вышеперечисленных таксонов агростофлоры Дальневосточного региона геномный состав установлен пока лишь у представителей родов *Elymus* и *Agrostis*, причем у них идентифицированы тетраплоидные виды с наличием общего генома [16, 17], что позволяет с уверенностью утверждать, что продолжающийся процесс микроэволюционной дифференциации этих двух родов осуществляется путем формирования рекомбинантных геномов. Что касается дифференциации остальных таксонов, то образование у них гибридных форм с рекомбинантными геномами мы можем лишь предполагать. Тем не менее, тот факт, что первые же результаты развернутых недавно работ по филогенетическому анализу дикорастущих злаков продемонстрировали высокую частоту встречаемости у них тетраплоидных форм с наличием общего генома, дает основания полагать, что данный тип гибридогенного видообразования широко распространен в семействе *Poaceae*. Следует лишь оговорить, что вследствие низкой фертильности гибридов ранних поколений он в большей степени должен быть присущ многолетникам, которые, во-первых, бывают стерильными лишь при первом цветении, но в последующие годы могут полностью, или хотя бы частично восстанавливать фертильность [18], во-вторых, могут компенсировать низкую фертильность переходом к вегетативному размножению с помощью длинных корневищ (вегетативный апомиксис), что, в частности, было обнаружено Н.С. Пробатовой при гибридогенезе зубровок (*Hierochloë*) [15].

Нельзя не упомянуть также в связи с этим о таком позволяющем избежать стерильности способе размножения растений, как агамоспермия (гаметофитный апомиксис), которая довольно широко распространена в семействе *Poaceae*. На существование тесной связи между агамоспермией, полиплоидией и отдаленной гибридизацией указывал еще В. Грант [19], однако, ссылаясь на мнение С.Д. Darlington [20], он считал агамные комплексы эволюционным тупиком, поскольку они «...в значительной степени утратили способность

порождать новые вариации, а следовательно, почти полностью или полностью лишились способности успешно справляться с разного рода изменениями, которые могут возникнуть в среде в будущем» [19, стр. 439]. Между тем, исследованиями последних лет показано, что переход на апомиктическое размножение отнюдь не является необратимым, как это считалось ранее. Установлено, что в своем развитии агамные комплексы проходят несколько стадий с постепенной стабилизацией хромосомно разбалансированного генома и возвратом в конечном итоге к половому воспроизводству [21]. Этот возврат обеспечивается тем, что детерминация гаметофитного апомиксиса связана с эпигенетическими механизмами регуляции, которые предполагают наличие факторов, дестабилизирующих систему семенного размножения у отдельных групп покрытосеменных растений и приводящих ее в стабилизированное состояние на определенных эволюционно значимых отрезках времени [22–24].

Таким образом, возможная низкая фертильность гибридов ранних поколений не является непреодолимым барьером на пути эволюционирования рекомбинантных форм злаков и становления их в качестве самостоятельных таксономических единиц.

Представленные данные свидетельствуют о том, что у злаков в ходе видообразования происходит чередование процессов дивергенции (кладогенеза) и конвергенции, осуществляемой за счет слияния путем гибридизации отдельных филетических ветвей. Если изобразить эти процессы схематично, то получится не классическое филогенетическое «древо», а сложная сеть переплетающихся филумов, вследствие чего и появился термин «сетчатая» или «ретикулярная» эволюция. И хотя у теории «сетчатой» эволюции было немало противников, постепенное накопление данных о существенной роли гибридизационных процессов и полиплоидии в эволюционном становлении цветковых растений в целом и семейства *Poaceae* в частности привело к тому, что в настоящее время убежденными сторонниками этой теории являются многие ведущие филогенетики мира. Что касается наших исследований, то они служат дополнительным и весьма весомым аргументом в пользу «сетчатого» ви-

дообразования в эволюционном становлении столь важного для удовлетворения потребностей человека и для сложения естественных растительных сообществ семейства.

Итогом проведенных исследований явилась разработка способа получения мейотических рекомбинаций между филогенетически удаленными геномами злаков, оригинальность которого подтверждена патентом (патент на изобретение № 13202). Неоспоримым преимуществом предложенного нами методического подхода является возможность получать мейотические рекомбинации между геномами разных представителей трибы *Triticeae*, причем выход этих рекомбинаций вследствие доминирования генетических систем базового генома на всех этапах мейотического цикла существенно выше и они могут иметь множественный характер.

Заключение

Полученные данные позволяют прогнозировать прохождение эволюционных процессов в природных симпатрических популяциях злаков и свидетельствуют, в частности, о том, что совместное произрастание тетраплоидных амфидиплоидов с наличием в их составе общего генома с высокой долей вероятности ведет к их гибридизации. Итогом такой гибридизации является образование форм, характеризующихся невероятно широким диапазоном изменчивости, возникающей за счет различных комбинаций хромосом и хромосомных сегментов дифференцированных геномов, при сохранении неизменной структуры общего генома. Образованные рекомбинантные формы легко скрещиваются между собой, формируя единую гибридную зону, в которой в ходе смены поколений происходит постоянное перераспределение генетического материала дифференцированных геномов и дальнейшее расширение спектра доступной отбору генотипической изменчивости, вследствие чего такая зона становится потенциальным очагом видообразования. Последующая адаптивная радиация гибридного материала в экологически расчлененной среде осуществляется путем отбора в разных экологических нишах форм с различными вариантами рекомбинантного генома. Это способствует быстрой дивергенции видов и возникновению на их основе новых таксономических единиц.

Список использованных источников

1. Soltis, P.S. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids / P.S. Soltis, D.E. Soltis // Proc. National Academy of Sciences USA. – 2000. – Vol. 97, № 13. – P. 7051–7057.
2. Wendel, J.F. Genome evolution in polyploids / J.F. Wendel // Plant Mol. Biol. – 2000. – Vol. 42, № 1. – P. 225–249.
3. Adams, K.L. Polyploidy and genome evolution in plants: Genome studies and molecular genetics / K.L. Adams, J.F. Wendel // Curr. Opin. Plant Biol. – 2005. – Vol. 8, № 1. – P. 135–141.
4. Feldman, M. Allopolyploidy – a shaping force in the evolution of wheat genomes / M. Feldman, A.A. Levy // Cytogenet. Genome Res. – 2005. – Vol. 109, № 1–3. – P. 250–258.
5. Карпеченко, Г.Д. К синтезу константного гибрида из 3-х видов / Г.Д. Карпеченко // Тр. Всесоюз. съезда по генетике, селекции, семеноводству и племенному животноводству, Ленинград, 10-16 янв. 1929 г. – Л., 1930. – Т. 2: Генетика. – С. 277–294.
6. Perrino, P. Collection and use of genetic resources of *Triticum* / P. Perrino // Evolution und Taxonomie von pflanzengenethischen Ressourcen. Festschrift für Peter Hanelt, Gatersleben, Germany, 5-6 Dezember, 1995. – S. 179–202.
7. Zohary, D. Hybridization between amphidiploids and the evolution of polyploids in the wheat (*Aegilops* – *Triticum*) group / D. Zohary, M. Feldman // Evolution. – 1962. – Vol. 16, № 1. – P. 44–61.
8. Тетраплоидные тритикале / В.Е. Бормотов, Н.И. Дубовец, А.М. Щербакова, Н.С. Бадаев. – Минск: Наука и техника, 1990. – 136 с.
9. Бадаева, Е.Д. Изменение хромосом ржи в кариотипе тритикале: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.15 / Е.Д. Бадаева. – М., 1984. – 181 л.
10. Towards an understanding of the biological action of the *Ph1* locus in wheat / T.E. Miller [et al.] // Proc. of the 9th Int. Wheat Genetic Symp., Saskatoon, Saskatchewan, Canada, 2–7 August 1998 / Saskatoon: University Extension Press, 1998. – Vol. 1. – P. 17–19.
11. Lapinsky, B. Wheat-rye chromosome translocations in improved lines of 4x-triticale / B. Lapinsky, T. Schwarzacher // Plant cytogenetics: Proc. Spring Symp., Cieszyn, 19–22 may 1997. – Katowice: Wydawnictwo Uniwersytetu Slaskiego. – 1998. – P. 210–215.
12. Chromosome constitution of tetraploid triticale / A.J. Lukaszewski [et al.] // Z. Pflanzenzuchtg. – 1984. – Bd. 93, № 3. – S. 222–236.
13. Цитогенетический анализ тетраплоидных тритикале / Е.Д. Бадаева [и др.] // Докл. ВАСХНИЛ. – 1988. – № 1. – С. 2–4.
14. Цвелев, Н.Н. Злаки СССР / Н.Н. Цвелев. – Л.: Наука, 1976. – 788 с.
15. Пробатова, Н.С. Хромосомные числа в семействе *Poaceae* и их значение для систематики, филогении и фитогеографии (на примере злаков Дальнего Востока России) / Н.С. Пробатова // Комаровские чтения. – Владивосток: Дальнаука, 2007. – Вып. 55. – С. 9–103.
16. Mason-Gamer, R.J. Polyploidy, introgression and complex phylogenetic pattern within *Elymus* / R.J. Mason-Gamer, M.M. Burus, M. Naum // Czech. J. Genet. Plant Breed. – 2005. – Vol. 41 (Special Issue). – P. 21–26.
17. Lu, B.R. The possible origin of the “StY”-genome *Elymus*: a new mechanism of allopolyploidy in plant / B.R. Lu, Q. Liu // Czech. J. Genet. Plant Breed. – 2005. – Vol. 41 (Special Issue). – P. 58.
18. Цвелев, Н.Н. Система злаков (*Poaceae*) и их эволюция / Н.Н. Цвелев. – Л.: Наука, 1987. – 75 с.
19. Грант, В. Видообразование у растений / В. Грант // М.: Мир, 1984. – 528 с.
20. Darlington, C.D. The evolution of genetic systems / C.D. Darlington // Cambridge: Cambridge University Press, 1939. – 149 p.
21. Кашин, А.С. Эволюция агамных комплексов у цветковых / А.С. Кашин // Изв. Саратовского университета. Сер. Химия. Биология. Экология. – 2009. – Вып. 1. – С. 41–50.
22. Carman, J.G. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixes, bispority, tetraspority and polyembryony / J.G. Carman // Biol. J. Linn. Soc. – 1997. – Vol. 61, № 1. – P. 51–94.
23. Developmental genetics of gametophytic apomixes / D. Grimanelli [et al.] // Trends in genetics. – 2001. – Vol. 17, № 10. – P. 597–604.
24. Koltunov, A.M. Apomixis: a developmental perspective / A.M. Koltunov, U. Grossniklaus // Annual Rev. of Plant Biol. – 2003. – Vol. 54. – P. 547–574.

Дата поступления статьи 2 сентября 2014 г.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ SSR-МАРКЕРОВ ДЛЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГИБРИДНЫХ ЛИНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ С ГЕНЕТИЧЕСКИМ МАТЕРИАЛОМ *T. DURUM* И *T. DICOCUM*

¹ Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук
Российская Федерация, 630090, г. Новосибирск, пр-т ак. Лаврентьева, 10

² ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.) является одной из основных продовольственных культур во всем мире. По площади посевов она занимает первое место среди других зерновых культур и составляет основной продукт питания для трети населения земного шара. Вместе с тем, в селекции мягкой пшеницы существует ряд серьезных проблем, связанных с необходимостью создания форм, характеризующихся устойчивостью к болезням, вредителям и неблагоприятным факторам внешней среды. Восприимчивость сортов мягкой пшеницы к грибным болезням приводит к огромным потерям урожая зерна и снижению показателей качества. Так, ежегодные потери урожая в ряде регионов Российской Федерации от стеблевой ржавчины могут достигать 60–70%, от бурой ржавчины 35–40% [1]. К важным факторам, вызывающим снижение урожайности мягкой пшеницы, относятся также абиотические стрессы, а именно, засуха, изменение температурного режима, повышенное содержания различных солей в почвах и т.д. [2].

Расширение генетического разнообразия по генам устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам достигается за счет использования генофонда диких и культурных сородичей мягкой пшеницы. Процесс межвидовой гибридизации обычно сопровождается множественной интрогрессией чужеродного генома, при этом значительная часть интрогрессированных фрагментов может не нести «целевые» локусы либо оказывать негативное влияние на проявление других признаков. Идентификация и диссекция генетических факторов, контролирующих хозяйственно ценные признаки пшеницы, существенно

облегчается технологиями, использующими методы молекулярного генотипирования и маркирования гибридных геномов [3]. Для выявления и локализации «целевых» генов и генных локусов можно использовать картирующие популяции либо методы ассоциативного картирования. Однако в обоих случаях необходим этап, который включает генотипирование гибридных образцов молекулярными маркерами для создания молекулярных «паспортов» гибридных форм с указанием хромосомной локализации и размеров фрагментов интрогрессии.

Известно, что геномный пул пшеницы твердой (*T. durum* Desf., A⁴B) и полбы обыкновенной (*T. dicoccum* Shuebl., A⁴B) содержит множество экономически важных аллелей генов, контролирующих устойчивость к различным заболеваниям и другие хозяйственно ценные признаки. Многие представители этих видов характеризуются толерантностью к листовой и стеблевой ржавчине, мучнистой росе и высоким содержанием белка в зерне [4]. Для повышения устойчивости мягкой пшеницы к грибным патогенам и ее улучшения по ряду других хозяйственно ценных признаков методом отдаленной гибридизации получены гибридные линии *T. aestivum*/*T. durum* и *T. aestivum*/*T. dicoccum* [5–6]. Линии характеризуются различной степенью устойчивости к популяциям грибных патогенов, типичных для Республики Беларусь и Западносибирского региона России [7]. Целью данной работы была сравнительная характеристика гибридных линий *T. aestivum*/*T. durum* и *T. aestivum*/*T. dicoccum* по числу, хромосомной локализации и протяженности фрагментов интрогрессии, перенесенных из генома тетраплоидных пшениц.

Материалы и методы

В работе были использованы сестринские линии поколения F_{6-7} , полученные от четырех комбинаций скрещивания сортов мягкой пшеницы *T. aestivum* с образцами тетраплоидных видов *T. durum* и *T. dicoccum*: 1) 183₂-2, 184₁-6 (Chinese Spring \times *T. durum*); 2) 190₄-1, 190₅-3, 190₆-1, 191₃-3, 195-3, 196-1, 200-3, 202-2 (*T. durum* \times Chinese Spring); 3) 221-1, 226-7 (*T. durum* \times Белорусская 80); 4) 206-2, 208-3, 213-1 (Pitic S62 \times *T. dicoccum*). Линии получены в Институте генетики и цитологии НАН Белару-

си и отобраны на основании изучения микроспорогенеза, наследования морфологических признаков и продуктивности в поколениях F_1 - F_4 [5-6].

Выделение ДНК, микросателлитный анализ, полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и электрофорез фрагментов ПЦР проводили согласно ранее описанной процедуре [8]. Для генотипирования были использованы маркеры WMC, GWM и GDM, специфичные для генома мягкой пшеницы [9, 10]. Список использованных маркеров представлен в табл. 1.

Таблица 1

Список микросателлитных маркеров, использованных для анализа полиморфизма родительских форм

Хромосома	Маркеры
1A	WMC24, GWM 905, 1097, 691, 752, 1148, 633, 99, 750
1B	GWM 1078, 1100, 18, 784, 806, 274, 268, 259, 818, 124
1D	GWM 603, 820, 232
2A	GWM 614, 726, 1198, 95, 122, 1036, 817, 312, 1070b, 1256, 1151
2B	GWM 1128, 630, 120, 1067, 1070a, 526, 619
2D	GWM 455, 102, 1264, 301
3A	GWM 369, 674, 720, 1110, 32, 480, 1071, 1229
3B	GWM 533, 493, 1037, 566, 285, 108, 980, 705, 1266
3D	GWM 1243, 977
4A	GWM 781, 929, 894, 1081, 1251, 832, 601
4B	GWM 910, 857, 513, 251, 1084, 538, 375, 6
4D	GDM 129, GWM 1163
5A	GWM 1154, 1057, 415, 1191, 1171a, 1236, 982, 126, 995, 156
5B	GWM 234, 544, 810, 499, 1043, 604, 1016
5D	GWM 190, 182 GDM 138
6A	GWM 334, 1009a, 1296, 1293, 1150, 1089, 427, 1017, 570
6B	GWM 1255, 518, 1233, 680, 889, 1076, 219
6D	GWM 904, 469, 1009b, 760
7A	GWM 681, 834, 60, 1171b, 573b, 260, 276, 1207, 63, 698, 1066, 942
7B	GWM 255, 951, 573a, 1184, 871, 274b, 302, 1144, 1175, 611, 577, 344
7D	GWM 1220, 1102

Результаты и обсуждение

Для определения локализации и протяженности фрагментов генома *T. durum* и *T. dicoccum* в геноме гибридных линий мягкой пшеницы было использовано 140 микросателлитных маркеров, картированных на генетических картах хромосом мягкой пшеницы *T. aestivum* (табл. 1). Для анализа хромосом геномов А и В использовано от 7 до 12 маркеров на хромосому. Хромосомы генома D были также проверены ограничен-

ным количеством маркеров для выявления возможных перестроек. Анализ продуктов ПЦР-маркеров, специфичных для мягкой пшеницы, показал, что, в среднем, более 87% маркеров геномов А и В амплифицируют фрагменты у образцов тетраплоидных видов, использованных для создания линий. Маркеры, специфичные для хромосом генома D, показали отсутствие амплификации фрагментов у тетраплоидных пшениц *T. durum* и *T. dicoccum*.

Из литературных данных известно, что SSR-маркеры, разработанные на основе генома гексаплоидной пшеницы *T. aestivum*, активно используются для изучения других видов пшеницы и межвидовых гибридов [11–12]. Ряд микросателлитных маркеров был использован для построения и интеграции в молекулярно-генетические карты хромосом пшениц различной ploидности и других видов злаков [13–15], в том числе карт хромосом *T. dicoccoides* и консенсусных карт *T. durum* [16–17]. При этом степень эффективности использования данных маркеров для характеристики чужеродных генотипов и межвидовых гибридов достаточно высока, независимо от уровня гомеологии хромосом.

Согласно литературным данным, при использовании специфичных для *T. aestivum* микросателлитных маркеров для характеристики А- и В-геномсодержащих тетраплоидных видов пшеницы отмечается различная степень амплификации фрагментов [18–23]. Так, Теклу с соавт., анализируя генетическое разнообразие 140 эфиопских образцов *T. durum* и *T. dicoccum*, показали, что только 3 и 1 маркер из 29, соответственно, не амплифицировали фрагменты в геноме этих видов [19]. В другой работе при анализе 73 образцов *T. dicoccum* различного географического происхождения отсутствует амплификация фрагментов у 10 пар праймеров из 29 [20]. Тем не менее, несмотря на наличие нуль-аллелей, полученные результаты свидетельствуют, что даже ограниченное число маркеров позволяет дифференцировать различные генотипы тетраплоидных видов пшеницы и классифицировать их согласно происхождению.

Оценка полиморфизма SSR-маркеров у родительских сортов (Chinese Spring, Pitic S62, Белорусская 80), использованных в данной работе при создании линий, в сравнении с тетраплоидными пшеницами *T. durum* и *T. dicoccum*, свидетельствует, что большинство использованных маркеров (в среднем, 75,3 и 87,5% для геномов А и В, соответственно) являются полиморфными, при этом порядка 70% маркеров амплифицировали фрагменты в геноме тетраплоидных видов. Такой уровень полиморфизма позволяет не только выявлять участки интрогрессии чужеродного генома, но и оценивать их размеры. Однако отмечается разный уровень

полиморфизма маркеров для отдельных хромосом. Так, например, все использованные в анализе маркеры, специфичные для хромосом 1В, 5В и 7В, были полиморфны независимо от родительского сорта мягкой пшеницы. Наиболее низкий полиморфизм отмечен для маркеров, специфичных для хромосом 3А, 4А и 5А, который составлял в среднем 63%.

Для определения хромосомной локализации и протяженности фрагментов генома *T. durum* и *T. dicoccum* было использовано в среднем, 5–11 полиморфных маркеров на каждую хромосому геномов А и В. Результаты генотипирования показали, что гибридные линии содержат от 4 до 12 фрагментов тетраплоидных пшениц (табл. 2). Для гибридных линий, полученных с участием *T. durum*, отмечены различия по числу, хромосомной локализации и длине чужеродных фрагментов как внутри одной и той же комбинации скрещивания, так и между комбинациями, полученными на основе разных сортов мягкой пшеницы. Следует также отметить значительные отличия по числу интрогрессированных фрагментов и хромосомной локализации для линии прямой и обратной комбинаций скрещивания с участием сорта Chinese Spring и *T. durum*. Так, линии прямой комбинации скрещивания содержат 6 фрагментов генома *T. durum*, в то время как в обратной комбинации обнаруживается не менее 8. Кроме того, у линий прямой комбинации скрещивания не выявлено фрагментов чужеродного генома в хромосомах 1В, 5А, 7А и 6-ой гомеологичной группы хромосом.

Можно отметить, что направление скрещивания оказывает влияние и на успех межвидовой гибридизации. Анализ полученных нами ранее результатов показал, что при скрещивании гексаплоидных и тетраплоидных пшениц оплодотворение протекает более успешно, когда опылителем является многохромосомный вид. Так, в комбинации, где в качестве материнского компонента скрещивания использовали *T. durum*, а в качестве отцовского – сорт пшеницы Chinese Spring, завязываемость составила 24,7%, тогда как в обратной – только 1,4%. Однако выполненность завязавшихся зерновок выше в комбинациях, где в роли опылителя выступали тетраплоидные виды: ни в одной такой комбинации скрещивания не выявлено зерновок без эндосперма.

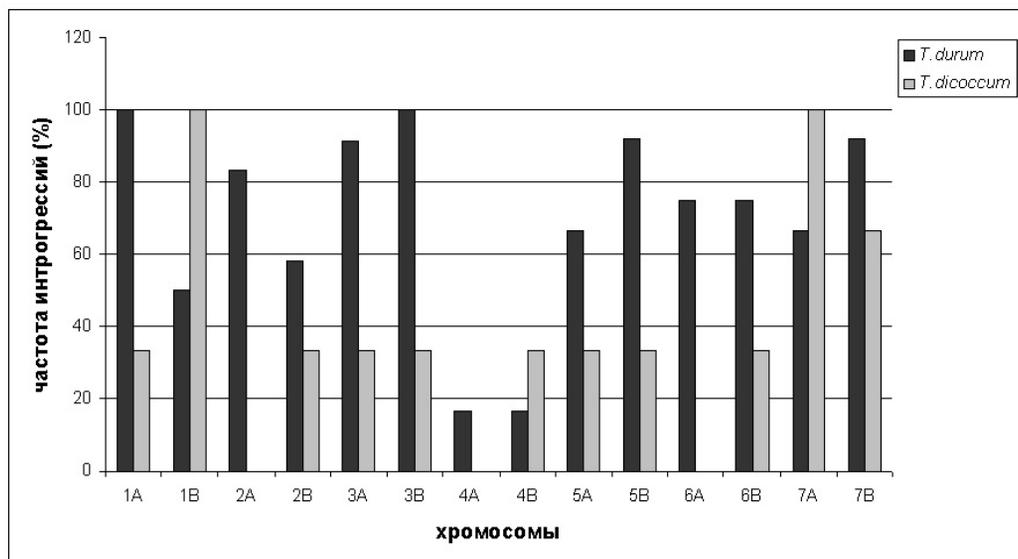


Рис. 1. Частота интрогрессий фрагментов генома *T. durum* и *T. dicoccum* в различные хромосомы гибридных линий

В обратных же комбинациях зерновки были более морщинистые, с плохо выполненным эндоспермом, а у части эндосперм практически отсутствовал [24].

Влияние генотипической среды на процесс создания межвидовых гибридов отмечается во многих работах. Достоверно установлено, что фертильность гибридов первого и последующих поколений, становление и цитологическая стабилизация гибридного генома, а также характер межгеномных замещений зависит от сорта-реципиента. Так, Хлебовой при изучении гибридов *T. durum*/*T. timopheevii*, полученных на основе скрещивания пяти сортов твердой пшеницы разного географического происхождения с тремя формами *T. timopheevii*, показано значительное варьирование признака озерненности в зависимости от генотипа как твердой пшеницы, так и пшеницы Тимофеева [25]. Детальное изучение роли генотипической среды в процессах формирования гибридного генома было выполнено на наборе интрогрессивных линий, полученных от скрещивания шести сортов мягкой пшеницы *T. aestivum* и шести форм тетраплоидных видов пшеницы (*T. durum*, *T. persicum*, *T. dicoccum*) с *T. timopheevii* [26–27]. Результаты проведенных исследований позволили заключить, что генотипические особенности сортов-реципиентов влияют на весь процесс интрогрессии генома *T. timopheevii*: от конъюгации хромосом до стабилизации гибридного генома. Уровень включения чужеродного генетического ма-

териала также существенно зависит от сорта мягкой пшеницы. Характеристика гибридных форм *T. aestivum*/*T. timopheevii* методами изоферментного анализа показала, что наибольшая частота включения генетического материала тетраплоидной пшеницы обнаружена у гибридных форм на основе сортов Саратовская 29 и Пиротрикс 28 в сравнении с сортом Новосибирская 67 [26, 28]. Известен факт, что уровень интрогрессии чужеродного генетического материала, равно как и число фрагментов, могут находиться в зависимости от факторов, которым подвергаются гибридные линии в процессе их создания и отбора. Так, имеются данные, что селекция межвидовых гибридов на устойчивость к грибным болезням приводит к преимущественному отбору форм, содержащих транслокации и замещения в определенных хромосомах. Это убедительно продемонстрировано на примере интрогрессивных линий *T. aestivum*/*T. timopheevii*, для которых показано, что спектры замещений и транслокаций у линий, устойчивых и восприимчивых к бурой ржавчине и мучнистой росе, значительно различаются [29].

Генотипирование гибридных линий *T. aestivum*/*T. durum* и *T. aestivum*/*T. dicoccum* выявило хромосомы с высокой и низкой частотой интрогрессии геномов тетраплоидных пшениц в хромосомы мягкой пшеницы. Так, более 80% гибридных линий из комбинаций скрещивания с *T. durum* содержат фрагменты интрогрессии в хромосомах 1A, 2A, 3A, 3B, 5B и 7B (рис. 1).

Низкий уровень интрогрессии отмечается для хромосом 4А и 4В, при этом у линий, полученных с участием *T. dicoccum*, не выявлены фрагменты интрогрессии в хромосоме 4А. Также следует отметить, что фрагменты генома тетраплоидных пшениц в хромосомах 5А и 7В обнаруживаются только в длинных плечах хромосом. Анализ локализации чужеродных фрагментов в сочетании с литературными данными о локализации генов устойчивости к грибным патогенам [30] позволяет предположить что «целевые» локусы, определяющие устойчивость гибридных линий, локализованы в хромосомах, характеризующихся высокой частотой интрогрессий.

Результаты молекулярного анализа свидетельствуют, что 4 гибридные линии (183₂-2 и 183₄-6 из комбинации CS/*T. durum* и 208₃-3 и 213-1 из комбинации Pitic S62/*T. dicoccum*) имеют высокое сходство как по хромосомной локализации фрагментов чужеродного генома, так и по протяженности этих фрагментов (табл. 2). Проведенное ранее кариотипирование линий методом С-окрашивания хромосом подтверждает почти полное генетическое сходство этих линий [7].

Анализ протяженности фрагментов генома тетраплоидных пшениц не выявил закономерностей в длинах фрагментов в зависимости от сорта мягкой пшеницы, использованного для гибридизации (рис. 2). Также не отмечено существенных различий по числу и протяженности интрогрессированных фрагментов, характерных для хромосом геномов А и В. По-видимому, это связано с достаточно высокой степенью гомеологии хромосом А и В геномов мягкой пшеницы и видов, использованных в гибридизации, и их высокой рекомбинационной способностью.

Из литературных данных известно, что генетический материал, перенесенный из геномов видов, более отдаленных от *T. aestivum*, включается крупными протяженными блоками. В качестве примера можно привести результаты, полученные при изучении межвидовых гибридов мягкой пшеницы с *T. timopheevii*, *Aegilops speltoides*, *Agropyron* [14, 31–32].

Заключение

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об эффективности использования микросателлитных маркеров, разработанных на основе генома мягкой пшеницы, для

характеристики линий *T. aestivum*/*T. durum* и *T. aestivum*/*T. dicoccum*, созданных в результате межвидовой гибридизации. В геноме гибридных линий выявлено от 4 до 12 фрагментов *T. durum* и *T. dicoccum* различной протяженности в хромосомах А и В геномов. Данные генотипирования можно использовать в дальнейшем для создания молекулярных «паспортов» гибридных линий и для ассоциативного картирования генов и генных локусов, контролирующих устойчивость к биотическим и абиотическим стрессам.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Президиума РАН «Динамика и сохранение генофондов» № 30.39, гранта РФФИ № 14-04-90000, гранта БРФФИ № Б14Р-013. Авторы благодарят др. М. Родер (IPK, Германия) за предоставленную возможность использования набора GWM и GDM праймеров.

Список использованных источников

1. Афанасенко, О.С. Проблемы создания сортов с длительной устойчивостью к болезням / О.С. Афанасенко // Защита и карантин растений. – 2000. – № 3. – С. 4–10.
2. Pardey, P.G. A strategic look at global wheat production, productivity and R&D developments / P.G. Pardey // Czech. J. Genet. Plant Breed. – 2011. – Vol. 47. – P. S9–S19.
3. Landjeva, S. Molecular markers: actual and potential contributions to wheat genome characterization and breeding / S. Landjeva, V. Korzun, A. Börner // Euphitica. – 2007. – Vol. 156. – P. 271–296.
4. Genetic analysis of slow-rusting resistance to leaf rust in durum wheat / S.A. Herrera-Foessel [et al.] // Crop Sci. – 2000. – Vol. 48. – P. 2132–2140.
5. Орловская, О.А. Цитологическая характеристика гибридов пшеницы, созданных при отдаленной гибридизации в трибе *Triticeae* / О.А. Орловская, Л.В. Корень, Л.В. Хотылева // Известия НАН Беларуси. – 2010. – № 4. – С. 50–55.
6. Орловская, О.А. Морфологический анализ гибридов пшеницы, созданных посредством отдаленной гибридизации в трибе *Triticeae* / О.А. Орловская, Л.В. Корень, Л.В. Хотылева // Известия НАН Беларуси. – 2011. – №3. – С. 29–33.

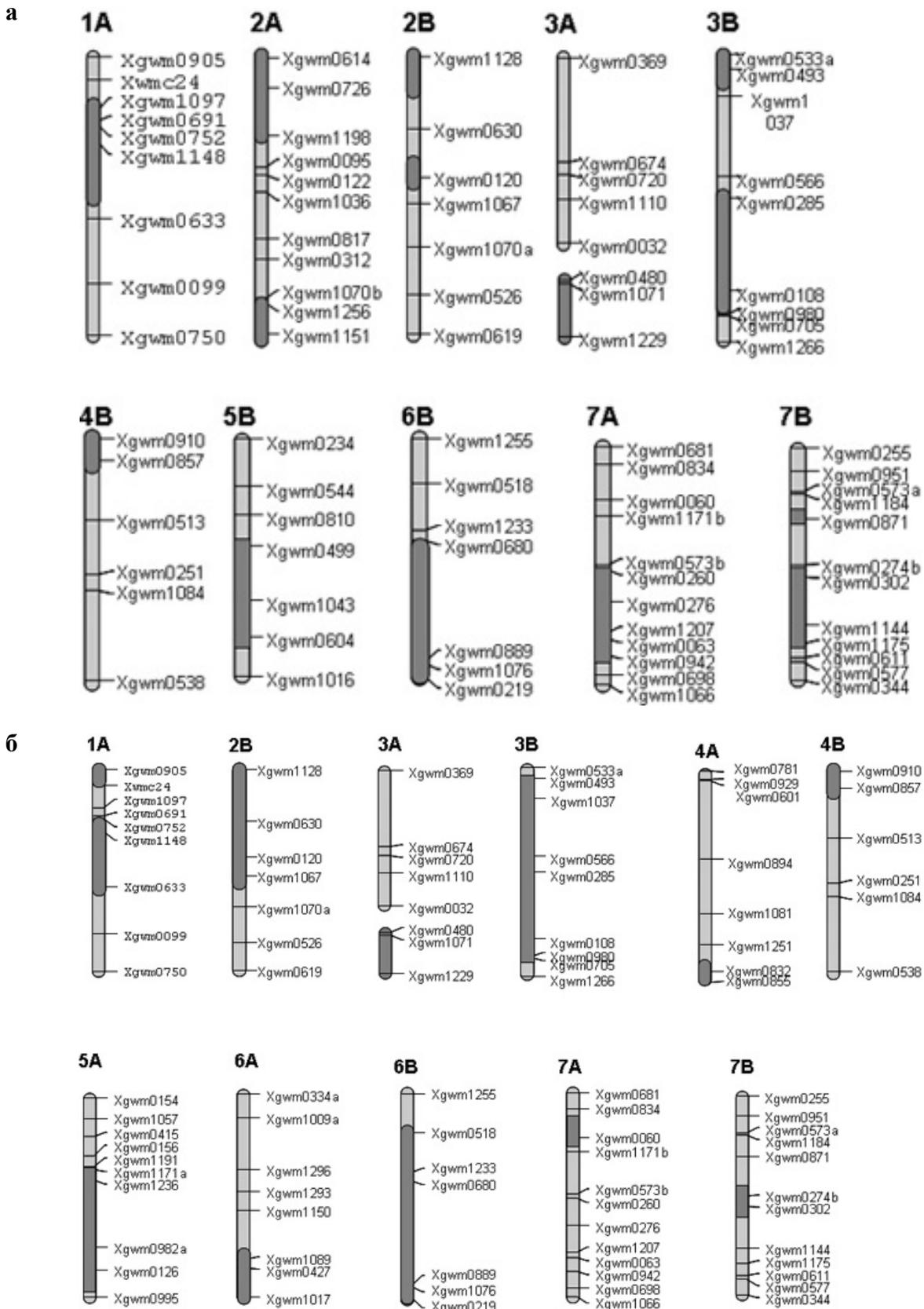


Рис. 2. Схематическое изображение рекомбинантных хромосом у гибридных линий 221-1 (а) и 202-2 (б). Фрагменты генома *T. durum* обозначены темными блоками.

С правой стороны от хромосом указаны микросателлитные маркеры, использованные в анализе

7. Сравнительная характеристика гибридных линий *Triticum aestivum*/*Triticum durum* и *Triticum aestivum*/*Triticum dicoccum* по геномному составу и устойчивости к грибным болезням в различных экологических условиях / И.Н. Леонова [и др.] // Генетика. – 2013. – Т. 49. – С. 1276–1283.
8. Молекулярный анализ линий тритикале, содержащих различные системы *Vrn* генов, с помощью микросателлиных маркеров и гибридизации *in situ* / И.Н. Леонова [и др.] // Генетика. – 2005. – Т. 41. – С. 1236–1243.
9. Ganal M.W., Röder M.S. Microsatellite and SNP markers in wheat breeding / M.W. Ganal, M.S. Röder // Genomics assisted Crop Improvement; eds. R.K. Varshney and R. Tuberosa. – Springer, 2007. – Vol. 2. – P. 1–24.
10. Somers, D.J. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.) / D.J. Somers, P. Isaac, K. Edwards // Theor. Appl. Genet. – 2004. – Vol. 109. – P. 1105–1114.
11. Leonova, I.N. The application of wheat microsatellite markers for the detection of interspecific variation in tetraploid *Aegilops* species with C and U genomes / I.N. Leonova, M.S. Röder, F. Nasyrova // Cereal Res. Commun. – 2009. – Vol. 37. – P. 335–343.
12. Kuleung, C. Transferability of SSR markers among wheat, rye, and triticale / C. Kuleung, P.S. Baenziger, I. Dweikat // Theor. Appl. Genet. – 2004. – Vol. 108. – P. 1147–1150.
13. Wheat genome structure: translocations during the course of polyploidization / E.A. Salina [et al.] // Funct. Integr. Genomics. – 2006. – Vol. 6. – P. 71–80.
14. Transferability of wheat microsatellites to diploid *Aegilops* species and determination of chromosomal localizations of microsatellites in the S genome / I.G. Adonina [et al.] // Genome. – 2005. – Vol. 48. – P. 959–970.
15. Mapping of 99 new microsatellite derived loci in rye (*Secale cereale* L.) including 39 expressed sequence tags / E.K. Khlestkina [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2004. – Vol. 109. – P. 725–732.
16. Description of durum wheat linkage map and comparative sequence analysis of wheat mapped DArT markers with rice and Brachypodium genomes / P. Colasuonno [et al.] // BMC Genetics. – 2013. – Vol. 14. – P. 114.
17. Molecular genetic maps in wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*: genome-wide coverage, massive negative interference, and putative quasi-linkage / J. Peng [et al.] // Genome Research. – 2000. – Vol. 10. – P. 1509–1531.
18. Microsatellite polymorphism in natural populations of wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*, in Israel / T. Fahima [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2002. – Vol. 104. – P. 17–29.
19. Analysis of microsatellite diversity in Ethiopian tetraploid wheat landraces / Y. Teklu [et al.] // Genet. Resour. Crop Evol. – 2006. – Vol. 53. – P. 1115–1126.
20. Teklu, Y. Simple sequence repeats marker polymorphism in emmer wheat (*Triticum dicoccon* Schrank): Analysis of genetic diversity and differentiation / Y. Teklu, K. Hammer, M.S. Röder // Genet. Resour. Crop Evol. – 2007. – Vol. 54. – P. 543–554.
21. Molecular diversity of Omani wheat revealed by microsatellites: I. Tetraploid landraces / S.A.I. Khanjari [et al.] // Genet. Resour. Crop Evol. – 2007. – Vol. 54. – P. 1291–1300.
22. Giovanni, F. Temporal variation of diversity in Italian durum wheat germplasm / F. Giovanni, M. Mazzeo, I. Greco // Genet. Resour. Crop Evol. – 2007. – Vol. 54. – P. 615–626.
23. Identification of durum wheat cultivars by a minimum number of microsatellite markers / G. Mangini [et al.] // Cereal Res. Commun. – 2010. – Vol. 38. – P. 155–162.
24. Khotyleva, L. Use of *Triticeae* tribe species for expanding and enriching genetic resources of *Triticum aestivum* / L. Khotyleva, L. Koren, O. Orlovskaya // 8th International Wheat Conference St. Petersburg, 1–4 June 2010. – P. 101–102.
25. Хлебова, Л.П. Влияние генотипического разнообразия видов и условий выращивания на фертильность потомства первого беккросса *Triticum durum* Desf. × *Triticum timopheevii* Zhuk. / Л.П. Хлебова // Известия Алтайского госуниверситета. – 2010. – № 3/1. – С. 64–68.
26. Шкутина, Ф.М. Роль сорта мягкой пшеницы в уровне интрогрессии чужеродного генетического материала в ее геном и в скорости стабилизации гибридной формы / Ф.М. Шкутина, Н.П. Калинина, Т.К. Усова // Генетика. – 1988. – Т. 24. – С. 98–109.
27. Изучение процессов интрогрессии и стабилизации гибридных популяций при скрещивании *T. timopheevii* с гексаплоидной

- и тетраплоидной пшеницами / Н.П. Калинина [et al.] // Цитогенетика с/х растений. – Новосибирск: ИЦиГ СО АН СССР. – 1989. – С. 98–128.
28. Калинина, Н.П. Малатдегидрогеназа как генетический маркер при анализе межвидовых гибридов пшеницы (*T. aestivum* L. × *T. timopheevii* Zhuk.) / Н.П. Калинина, М.В. Черкасова, Е.Б. Будашкина // Генетика. – 1987. – Т. 23. – С. 1240–1246.
29. Закономерности межгеномных замещений гибридов пшеницы и их использование для создания генетической номенклатуры хромосом *T. timopheevii* / Е.Д. Бадаева [и др.] // Генетика. – 2010. – Т. 46. – С. 869–886.
30. Catalogue of Gene Symbols for Wheat [Electronic resource] / R.A. McIntosh [et al.]. – 2013. – Mode of access: <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/>.
31. Molecular characterization of durum and common wheat recombinant lines carrying leaf rust resistance (*Lr19*) and yellow pigment (*Y*) genes from *Lophopyrum ponticum* / W. Zhang [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2005. – Vol. 111. – P. 573–582.
32. Marker-assisted development and characterization of a set of *Triticum aestivum* lines carrying different introgressions from the *T. timopheevii* genome / Е.М. Timonova [et al.] // Mol. Breed. – 2013. – Vol. 31. – P. 123–136.

Дата поступления статьи 1 сентября 2014 г.

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛОВЕЖСКОГО ЗУБРА (*BISON BONASUS* L.) ПО ОДИНОЧНЫМ НУКЛЕОТИДНЫМ ЗАМЕНАМ ГЕНОВ *DRB3* И *DQB* ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Европейский (беловежский) зубр (*Bison bonasus* L.) – единственный дикий вид подсемейства бычьих (*Bovinae*) Европы, уцелевший до наших дней [1]. В настоящее время зубр имеет статус «восстанавливаемый вид», включен в Красный список МСОП, Приложение III Бернской Конвенции, Красные книги Беларуси, России, Польши, Украины, Литвы. Европейский зубр спасен от исчезновения. В тоже время под угрозой остается выживание вида в исторической перспективе [2].

В прошлом зубр занимал обширные зоны широколиственных и смешанных лесов Европы (кроме стран, расположенных на ее северной части), Кавказа, Закавказья и Северного Ирана. *Bison bonasus* подразделяется на 3 подвида: *Bison bonasus bonasus Linnaeus* – беловежский зубр, данная линия происходит от 5 животных-основателей; *Bison bonasus caucasicus Satunin* – кавказский зубр, линия берет начало от 12 животных-родоначальников, включая и основателей беловежской линии, уцелевших после истребления вида к началу XX века; *Bison bonasus hungarorum Kretzoi* – трансильванско-карпатский горный зубр, получивший статус подвида. Из доживших до наших дней подвидов зубра только равнинный (беловежский, европейский) сохранился в чистом виде. Последний представитель трансильванско-карпатского горного зубра исчез в XVII веке. Кавказский подвид был истреблен в XX веке и ныне представлен гибридами с *Bison b. bonasus* и *Bison bison* разной степени кровности.

Пережитый популяцией зубра этап «бутылочного горлышка» (bottleneck) привел к повышению уровня инбридинга и распространению в популяциях рецессивных аллелей.

Это могло снизить общую жизнеспособность животных и даже привести к вымиранию вида в целом [3].

Для оздоровления генетически обедненной популяции, в начале XIX века в Беловежскую пущу был завезен самец кавказской линии зубров [4, 5]. Особь была изъята из популяции еще не испытавшей значительного сокращения численности. Этот бык по кличке Кавказ за свою жизнь оставил 7 телят (3 быка и 4 коровы) от беловежских зубриц. Они и стали основателями линии зубров, получившей название «кавказско-беловежская». Эти зубры и их потомство были отловлены и вывезены из Беловежской пущи только в 1861 году.

Крупнейшая популяция зубра в Беловежской пуще в настоящее время разделена на две части – белорусскую и польскую. Эти субпопуляции имеют единое происхождение, но последние десятилетия отличаются по принципу разведения – польская популяция сохранила чистокровную беловежскую линию, а белорусская имеет гибридное происхождение (кавказско-беловежская линия). Результаты, полученные в ходе микросателлитного анализа, проведенного нами, показали, что, несмотря на единое происхождение, высокое сходство белорусской и польской популяций европейского зубра, различные принципы разведения привели к явным отличиям в их генетической структуре. Наличие уникальных аллелей микросателлитных локусов подтверждает гибридное происхождение белорусского поголовья [6].

Генетический потенциал современных зубров сильно обеднен, отмечаются признаки вырождения беловежской линии зубров, повышенная восприимчивость животных к инфекционным заболеваниям. Известно, что

снижение генетического разнообразия генов, ответственных за формирование иммунного ответа, уменьшает чувствительность популяции к патогенам. Инфекционные заболевания считают одной из основных причин вымирания редких видов диких животных. Инбридинговая депрессия, связанная с пережитым популяцией этапом «бутылочного горлышка», может понизить способность особей вызывать иммунный ответ из-за потери вариативности генов, отвечающих за устойчивость к инфекциям. Это относится к высоко полиморфным генам главного комплекса гистосовместимости (Major Histocompatibility Complex (MHC)) позвоночных, инициирующим иммунный ответ. Поэтому одним из направлений стратегии разведения беловежского зубра является проведение мероприятий, направленных на увеличение гетерогенности популяции за счет снижения вероятности потери одного или нескольких аллелей генов MHC.

Главный комплекс гистосовместимости представляет собой группу генов и кодируемых ими белковых рецепторов, расположенных на поверхности клеток. Комплекс генов MHC семейства полорогих (*Bovidae*), к которому относится зубр (*Bison bonasus*) и домашний крупный рогатый скот (*Bos taurus*), расположен на коротком плече 23-й аутосомной хромосомы, состоит из 3500 п.н. и содержит более 220 генов [7]. Они играют важнейшую роль в распознавании чужеродных агентов и развитии иммунитета. Антиген-представляющие молекулы, кодируемые MHC, относятся к классическим генам I, II и III классов. Молекулы главного комплекса гистосовместимости класса II кодируются отдельным набором генов. Эти гены расположены вблизи центromеры и включают несколько локусов (*DPA*, *DPB*, *DQA*, *DQB*, *DRA*, *DRB*).

В данной статье представлены исследования по полиморфизму генов MHC: *DRB3* и *DQB*. Для ведения дальнейшей селекционной работы по сохранению разнообразия зубра необходимо учитывать генетический потенциал всех популяций вида – как возможного источника новых аллельных вариантов генов. В нашем исследовании проведено сравнение генетической структуры европейского зубра белорусской и польской популяций.

Материалы и методы

Для выделения ДНК использовался стандартный метод солевой экстракции [8] с некоторыми модификациями [6]. Прямое секвенирование ПЦР-фрагментов генов – наиболее распространенный метод для описания их нуклеотидной последовательности и выявления полиморфизма. Однако из-за присутствия нескольких аллелей в локусе, секвенирование может оказаться неинформативным – нуклеотидные последовательности разных аллельных вариантов накладываются друг на друга. Для решения данной проблемы необходимо клонировать амплифицированные фрагменты в вектор, при этом в плазмиду лигируется только один аллель исследуемого локуса. Нами в качестве вектора использованы плазмиды pGEM-3Zf(+) и pBluescript IKS/SK(+). Амплификация для наращивания T-концов осуществлялась на амплификаторе Bio-Rad (Германия) при 72 °C в течение 2 часов. Очистка полученных рестриктов проводилась набором Gel Extraction Kit (Fermentas, Литва).

Характеристики ПЦР праймеров, использованных для амплификации фрагментов обоих генов MHC, представлены в табл. 1. Амплифицируемые участки охватывают область 1-го интрона 2-го экзона изучаемых генов.

Таблица 1

Характеристика праймеров, используемых для амплификации фрагментов генов *DRB3* и *DQB* главного комплекса гистосовместимости

Локус	Праймер	Последовательность праймера (5'-3')	Размер ампликона, п.н.	Ссылка
DRB3	HLO30-F HLO32-R	ATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCC TCGCCGCTGCACAGTGAAACTCTC	284	[9]
DQB	DQB-F DQB-R	TCCCCCGCAGAGGATTCGTG CGCACTCACCTCGCCGCTGC	217	[10]

Полимеразную цепную реакцию осуществляли в 10 мкл смеси, содержащей 5–10 нг геномной ДНК, по 10 пМоль каждого праймера, 50 mM MgCl₂, 4 mM dNTP, 1x ПЦР-буфера, 1,7 ед Taq-полимеразы (Праймтех, Беларусь). Амплификация осуществлялась на автоматическом программируемом термоциклере фирмы BioRad (Германия) при следующих температурных условиях: 95 °С – 15 мин; 35 циклов 94 °С – 30 с, 55 °С – 30 с, 72 °С – 30 с; финальную элонгацию мы увеличили до 15 мин при 72 °С для наращивания А-концов для лигирования с вектором. Амплификация каждого локуса проводилась независимо, в отдельной пробирке.

Продукты реакции визуализировались на 1,5%-ном агарозном геле с использованием маркера молекулярного веса Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder. Перед проведением лигирования ПЦР-продукты очищались набором DNA Gel Extraction Kit (Fermentas, Литва). Далее проводили клонирование фрагмента гена в вектор. Для этого ПЦР-продукт размером 217/284 п.н. лигировали в полученный Т-вектор. Лигазная смесь включала: 20 нг Т-вектора, 20 нг вставки, 1 мкл 10x лигазного буфера, 5U T4-лигазы и доводили объем смеси до 10 мкл H₂O.

Далее лигазную смесь использовали для трансформации бактерии *E. coli*, штамм XLBlue [11].

Для отбора колоний, несущих вектор со вставкой, применяли бело-голубую селекцию. Для этого добавляли в жидкую LB-среду IPTG и X-Gal. Вектор несет в себе часть гена *lacZ* (*lacZα*), другая часть данного гена содержится в бактериальной хромосоме. Продукт этого гена обуславливает голубую окраску колоний, несущих вектор, на среде, содержащей X-Gal и IPTG.

Однако при лигировании вставки в вектор последовательность *lacZα* прерывается, т.к. содержит внутри себя полилинкер (Multiple Cloning Site). Таким образом, клетки, несущие вектор со вставкой, образуют белые, неокрашенные колонии. Отобранные таким образом колонии пересевались на отдельные чашки Петри с твердой LB-средой, содержащей ампициллин.

Скрининг полученных колоний на наличие вставки проводили с помощью ПЦР со стандартными праймерами M13 к полилинкеру плазмиды (рис. 1).

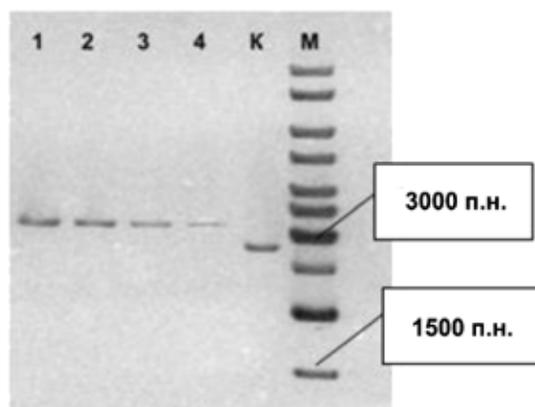


Рис. 1. Электрофореграмма скрининга колоний на наличие вставки с праймерами M13

1–4 – образцы (вектор (2 886 п.н.) + вставка (393 п.н.)); К – контроль, вектор без вставки (2 886 п.н.); М – маркер

Как показано на рис. 1, вставка фрагмента гена визуализируется на электрофореграмме полосой размером 3 279 п.н. (№ 1–4).

Секвенирование полученных клонов проводилось по обеим цепям фрагмента с использованием Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) на приборе 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Результаты и обсуждение

Основными особенностями комплекса МНС являются его значительная полигенность, то есть наличие нескольких неаллельных генов, белковые продукты которых имеют похожее строение и выполняют идентичные функции, а также ярко выраженный полиморфизм – присутствие многих аллельных форм одного и того же гена. Сохранение разнообразия генов МНС является основным элементом эффективности программ по сохранению и разведению редких и вымирающих видов животных [12].

Каждый из аллелей генов МНС обеспечивает возможность реагировать на определенный набор пептидов антигенов. Поэтому индивидуумы, обладающие гетерозиготными генотипами МНС генов, способны более эффективно индуцировать иммунный ответ на действие множества антигенов и, следовательно, имеют намного больше шансов противостоять инфекциям.

Наибольшим полиморфизмом обладают участки МНС генов, кодирующие внеклеточ-

ные домены и формирующие выемку (пептид-связывающий участок), где связываются антигены внутриклеточных или внеклеточных патогенов. Данный полиморфизм главным образом концентрируется во втором экзоне генов МНС класса II.

Wegner с соавт. выявил положительную связь между разнообразием патогенов, населяющих организм и разнообразием аллелей генов МНС в популяции [13]. Авторы предположили, что уровень инфекционной нагрузки влияет на полиморфизм МНС генов на популяционном уровне. Группа ученых из Канады также выдвинула теорию, что полиморфизм генов МНС класса II – степень разнообразия зависит от широты обитания популяции. В северных широтах разнообразие генов в популяциях выше, чем в южных [14].

Пережитое популяцией резкое снижение численности может привести к ограничению разнообразия МНС генов и увеличить уязви-

мость вида, как это было описано у гепарда [14]. Однако некоторые виды продолжают существовать, несмотря на низкий полиморфизм и даже мономорфизм, вызванный эффектом «бутылочного горлышка» в прошлом [15, 16]. Авторы приходят к мнению, что система МНС является только одной из многих систем защиты от патогенных инфекций и уровень ее полиморфизма не оказывает большого влияния на длительную выживаемость популяции. Эти данные подтверждают роль балансирующей селекции как механизма по сохранению вариабельности генов МНС в естественных популяциях.

Нами проанализирован полиморфизм 2-го экзона гена *DRB3* главного комплекса гистосовместимости у особей европейского зубра из белорусской популяции НП «Беловежская пуца».

Таблица 2

Сравнение частот аллелей гена *DRB3* главного комплекса гистосовместимости белорусской и польской популяции

Популяции	Количество особей	Vibo <i>DRB3</i> *-0101	Vibo <i>DRB3</i> *-0201	Vibo <i>DRB3</i> *-0301	Vibo <i>DRB3</i> *-0401
Белорусская	56	0,563	0,384	0,053	0
Польская*	172	0,346	0,270	0,364	0,020

* – Radwan J., 2007 [14].

Из четырех аллелей гена *DRB3* МНС, описанных для европейского зубра [17–19], в белорусской популяции обнаружено три – Vibo*DRB3**-0101, Vibo*DRB3**-0201, Vibo*DRB3**-0301. Существенно различаются частоты встречаемости каждого аллеля (табл. 2). Установлено, что наиболее редкий аллель для белорусской популяции Vibo-*DRB3**0301 является наиболее распространенным в польской. Аллель Vibo*DRB3**-0401 – редкий для польской популяции, частота встречаемости 2%. В проанализированной нами выборке он выявлен не был [20].

Такое количество аллельных вариантов гена *DRB3* является достаточно низким, по сравнению с разнообразием аллельных вариантов, описанных для крупного рогатого скота (*Bos taurus*, 105 аллелей), американского бизона (*Bison bison*, 15 аллелей) и других копытных животных,

таких как благородный олень (*Cervus elaphus*), козы, овцы [16]. Этот факт отражает резкое снижение численности популяции зубра в начале XX века. Другие виды копытных, которые подверглись эффекту «бутылочного горлышка», также демонстрируют ограниченное разнообразие генов МНС, например, американский лось (*Alces alces*) [16].

Полиморфизм гена *DQB* главного комплекса гистосовместимости изучен нами у европейского зубра впервые. Проведено исследование нуклеотидной последовательности 2-го экзона гена *DQB* МНС у 30 особей белорусской и 30 особей польской популяций европейского зубра. Полученный фрагмент гена *DQB* имеет размер 217 п.н.

В белорусской популяции выявлено 3 аллельных варианта гена *DQB* – Vibo-*DQB*-Bel1, Vibo-*DQB*-Bel2 и Vibo-*DQB*-Bel+Poll (рис. 2).

Аллельные варианты различаются между собой рядом несинонимичных замен (рис. 5). Также аллель *Bibo-DQB-Bel1* характеризуется делецией в три нуклеотида (161–163 п.н.), что влечет выпадение 54 кодона – аминокислоты лизина (рис. 3).

В польской популяции выявлено 3 аллельных варианта гена *DQB* – *Bibo-DQB-Bel+Pol1*, *Bibo-DQB-Pol2*, *Bibo-DQB-Pol3* (рис. 4).

Аллельные варианты, выявленные в польской популяции зубра, также имеют различия в нуклеотидных последовательностях. Аллель *Bibo-DQB-Pol2*, подобно аллелю *Bibo-DQB-Bel1* белорусской популяции, имеет делецию в три нуклеотида в положении 160 п.н., что ведет к выпадению 53 кодона – аминокислоты глутамина (рис. 5).

Известно, что у многих представителей копытных есть общая группа аллелей, у которых присутствует подобная делеция [18].

Распределение частот встречаемости аллельных вариантов гена *DQB* белорусской и польской популяции представлено в табл. 3.

Выявлено 5 аллельных вариантов данного гена, из которых 2 характерны только для белорусской популяции (*Bibo-DQB-Bel1*, *Bibo-DQB-Bel2*), 2 – только для польской (*Bibo-DQB-Pol2*, *Bibo-DQB-Pol3*) и 1 аллельный вариант (*Bibo-DQB-Bel+Pol*) присутствует в обеих популяциях.

Наибольшая частота в белорусской популяции зубров выявлена у аллеля *DQB Bibo-DQB-Bel1* – 67,2%. Второй аллель-

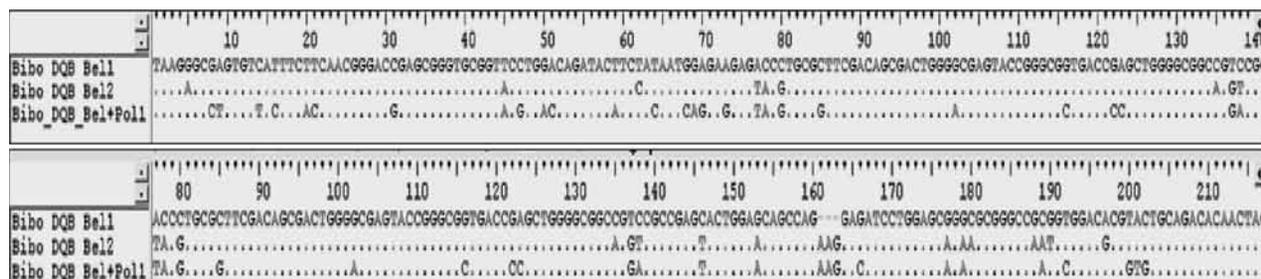


Рис. 2. Нуклеотидные последовательности аллельных вариантов гена *DQB* МНС в белорусской популяции зубра «» – повторяющиеся нуклеотиды; «-» – отсутствие нуклеотида

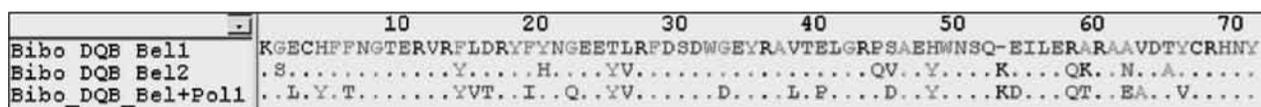


Рис. 3. Сравнение аминокислотных последовательностей, детерминируемых аллельными вариантами гена *DQB* МНС в белорусской популяции зубра

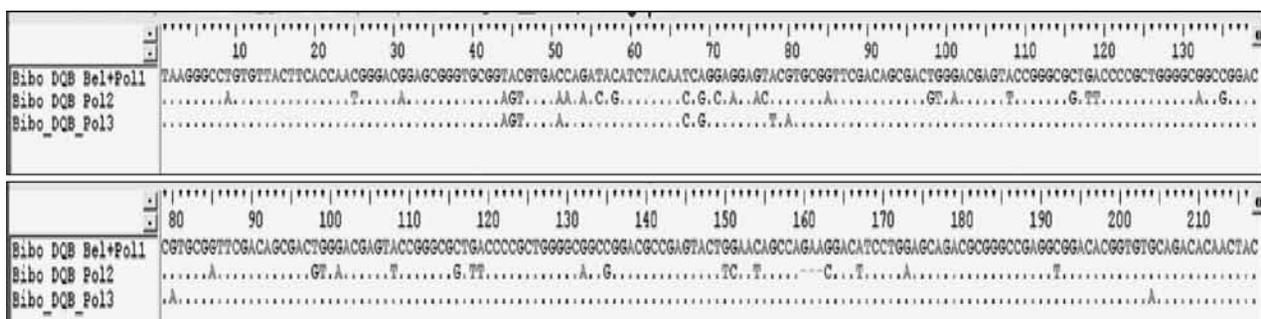


Рис. 4. Нуклеотидные последовательности аллельных вариантов гена *DQB* МНС в польской популяции зубра

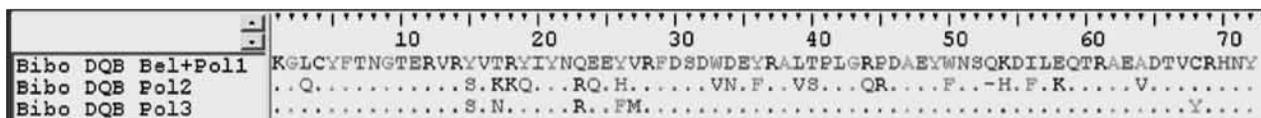


Рис. 5. Сравнение аминокислотных последовательностей, детерминируемых аллельными вариантами гена *DQB* МНС в популяции европейского зубра

Таблица 3

Сравнение частот аллелей гена *DQB* главного комплекса гистосовместимости белорусской и польской популяции европейского зубра

Популяции	Количество особей	Vibo-DQB-Bel1	Vibo-DQB-Bel2	Vibo-DQB-Bel+Pol	Vibo-DQB-Pol2	Vibo-DQB-Pol3
Белорусская	30	0,672	0,083	0,245	–	–
Польская	30	–	–	0,850	0,083	0,067

ный вариант, характерный для только белорусских особей, Vibo-DQB-Bel2, имеет частоту 8,3%. Аллель гена *DQB* Vibo-DQB-Bel+Pol1, представленный в обеих популяциях, имеет частоту 24,5% в белорусской и 85% в польской популяции. Аллели Vibo-DQB-Pol2 и Vibo-DQB-Pol3 встречаются в популяции с частотой 8,3% и 6,7% соответственно.

В графическом изображении аллельных вариантов гена *DQB* особей белорусской и польской популяций в филогенетическом древе четко выделяется 3 группы кластеров – кластеры I, II, III, IV; V (рис. 6).

Кластеры I и II сформированы аллельными вариантами Vibo-DQB-Bel1 и Vibo-DQB-Bel2. Аллели гена *DQB*, выявленные у особей, принадлежащих к польской популяции, образуют кластеры III и IV – Vibo-DQB-Pol3, Vibo-DQB-Pol2, соответственно. Аллельный вариант Vibo-DQB-Bel+Pol1, выявленный у представителей обеих популяций, образует один кластер V.

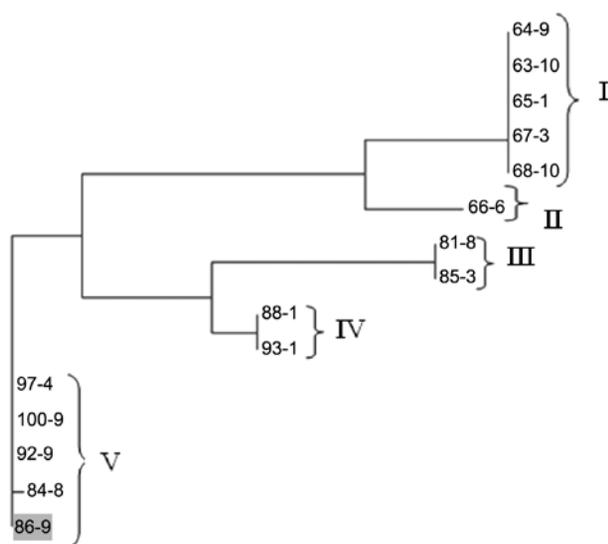


Рис. 6. Генетические различия аллельных вариантов гена *DQB* МНС особей белорусской и польской популяций европейского зубра

Считается, что высокое различие имеющихся аллельных вариантов генов (множество несинонимичных замен) поддерживается в ходе естественного отбора. Особи, имеющие большее аллельное разнообразие генов МНС имеют селективное преимущество, поскольку они могут сформировать иммунный ответ против более широкого спектра антигенов.

Заключение

Таким образом, показаны различия в генетической структуре белорусской и польской популяций европейского зубра по частотам аллельных вариантов генов главного комплекса гистосовместимости *DRB3* и *DQB*. Выявлен аллель Vibo-DRB3*0301 гена *DRB3*, имеющий очень низкую частоту в белорусской популяции европейского зубра. Выявлено присутствие в польской популяции уникальных аллельных вариантов гена Vibo-DQB-Pol2 и Vibo-DQB-Pol3, которые являются ценными для увеличения генетического разнообразия белорусской популяции.

Выявление особей, несущих уникальные аллельные варианты микросателлитных локусов и генов МНС, будет способствовать увеличению генетического разнообразия и вовлечению уникальных генов и аллелей в селекционный процесс, что, несомненно, позволит повысить жизнеспособность вида.

Изучение популяций различных видов животных с помощью молекулярно-генетических методов является важным этапом при разработке мер по сохранению биоразнообразия. Использование филогенетического анализа позволяет разрабатывать более эффективные меры охраны редких и исчезающих видов, а также применять оптимальные схемы хозяйственного использования ресурсных видов дикой фауны.

Список использованных источников

1. Зубр. Морфология, систематика, эволюция, экология // М.: Наука, 1979. – С. 91–111, 442–470.

2. План мероприятий по сохранению и рациональному использованию беловежского зубра на 2015–2019 годы // Минск, 2014. – 16 с.
3. O'Brien, S.J. Trends in Ecology and Evolution / S.J. O'Brien, F.F. Evermann, // № 3. – 1988. – P. 254–259.
4. Корочкина, Л.Н. Зубр Беловежской пуши / Л.Н. Корочкина, В.А. Вакула // Минск, 2008. – С. 18–20.
5. Сипко, Т.П. Зубр. Популяционно-генетический анализ / Т.П. Сипко // Вопросы современного охотоведения. – 2002. – С. 386–405.
6. Михайлова, М.Е. Сравнение аллельных частот микросателлитных локусов белорусской и польской популяций европейского зубра (*Bison bonasus*) / М.Е. Михайлова, Ю.В. Медведева // Весці НАН Беларусі. – № 2. – 2013. – С. 47–52.
7. Abbas, A.K. Low MHC DRB class II diversity in the mountain goat: past bottlenecks and possible role of pathogens and parasites / A.K. Abbas, A.H. Lichtman, S. Pillai // Cellular and Molecular Immunology. – 2007. – P. 566.
8. Введение в молекулярную генную диагностику сельскохозяйственных животных / Н.А. Зиновьева [и др.] / ВИЖ. – 2002. – 112 с.
9. Characterization of *Bison bison* major histocompatibility complex class II haplotypes / D.L. Trull [et al.] // Immunogenetics. – Vol. 57(11). – 2005. – P. 845–854.
10. Characterization of BoLA-DRB3.2 Alleles in Hanwoo (Korean cattle) by Sequence Based Typing (SBT) / H. J. Jeong [et al.] // Asian-Aust. J. Anim. Sci. – Vol. 20, No. 12. – 2007. – P. 1791–1797
11. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис – М.: Мир, 1984. – 189 с.
12. Hughes, A.L. MHC polymorphism and the design of captive breeding programs / A.L. Hughes // Conservation Biology. – 1991. – Vol. 5. – P. 249–251.
13. Wegner, K.M. Multiple parasites are driving major histocompatibility complex polymorphism in the wild / K.M. Wegner, T.B.H. Reusch, M. Kalbe // Journal of Evolutionary Biology. – 2003. – Vol. 16. – P. 224–232.
14. Mainguy, J. Low MHC DRB class II diversity in the mountain goat: past bottlenecks and possible role of pathogens and parasites / J. Mainguy // Conservation Genetics. – 2009. – Vol. 15. – P. 467–474.
15. O'Brien, S.J. Genetic-basis for species vulnerability in the cheetah / S.J. O'Brien [et al.] // 1985. – Science. – Vol. 227. – P. 1428–1434
16. Mikko, S. Low major histocompatibility complex class II diversity in European and North American moose / S. Mikko, L. Andersson // Proc Natl Acad Sci USA. – Vol. 92. – 1995. – P. 4259–4263
17. Radwan, J. Does reduced MHC diversity decrease viability of vertebrate populations? / J. Radwan // Biological Conservation. – № 143. – 2010. – P. 537–544.
18. MHC-DRB3 variation in a free-living population of the European bison, *Bison bonasus* / J. Radwan [et al.] // Molecular Ecology. – Vol. 16. – 2007. – P. 531–540.
19. Tokarska, M. Genetic status of the European bison *Bison bonasus* after extinction in the wild and subsequent recovery / M. Tokarska // Mammal Rev. – Vol. 41(2). – 2011. – P. 151–162.
20. Medvedeva, Y. MHC genes variation in the Belorussian population of European bison (*Bison bonasus*). International conference in Landscape Genetics, Bialowieza, Polska. 10–12 October 2011 / Y. Medvedeva, M. Mikhailova // Mammal Research Institute Polish Academy of Science. – Bialowieza, 2011. – P. 27.

Дата поступления статьи 24 сентября 2014 г.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОВ РЕКОМБИНАНТНОГО ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И АПОПТОЗ РАКОВЫХ И ИММОРТАЛИЗИРОВАННЫХ КЛЕТОК

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

²РУП «НПЦ НАН Беларуси по животноводству»
Республика Беларусь, 222160, г. Жодино, ул. Фрунзе, 11

Введение

Впервые лактоферрин (ЛФ) был обнаружен в молоке коров. Позже ЛФ был найден в клетках матки, в миелоидных клетках (особенно в гранулоцитах) и клетках мозга [1]. Первоначально ЛФ рассматривался как железосвязывающий белок молока с бактериостатическими свойствами. Железо участвует в различных метаболических процессах, и регуляция его концентрации чрезвычайно важна. В частности, аномально высокое содержание железа приводит к повышенной продукции свободных радикалов, повреждающих белки и ДНК [2]. Кроме того, избыток железа приводит к активации микробного роста [3]. Существуют две формы белка ЛФ – железонасыщенная (холо-лактоферрин) и железоненасыщенная (апо-лактоферрин). ЛФ, обладая высоким сродством к железу, связывает избыток ионов этого металла, которые могут находиться в слизистой кишечника, и тем самым противодействовать микробным инфекциям, а также уменьшать повреждения клеток, вызываемые свободными радикалами [4–5].

Начальная экспрессия гена ЛФ в эмбриогенезе млекопитающих отмечается на стадии 2–4 клеток и продолжается до формирования бластоциста, а затем прекращается до созревания плода, когда данный белок появляется в нейтрофилах крови и эпителиальных клетках дыхательного и пищеварительного трактов [6]. Во взрослом организме ген ЛФ экспрессируется в эпителиальных клетках желез внутренней секреции, а белок секретруется в биологические жидкости. Наиболее высокая концентрация ЛФ в молозиве и молоке, но в меньших количествах он обнаруживается также в слюне, слезной жидкости, кишечнике и репродуктивных тканях [7–8].

В опухолевых клетках ген ЛФ не экспрессируется [9–14]. Эти данные позволили высказать предположение о возможности противоопухолевой активности ЛФ. Блокировка экспрессии гена ЛФ в раковых клетках может быть связана с эпигенетическим механизмом, определяемым увеличенным метилированием цитозина в ГЦ-богатых районах генного промотора [15]. При подкожном введении мышам в дозе 1 мг человеческий ЛФ (в форме лишенного железом холо-лактоферрина) ингибировал рост перевиваемых опухолей, индуцируемых *v-gas*-трансформированными фибробластами и метилхолантреном, а также обладал антиметастазной активностью [16]. Коровий ЛФ ингибировал карциногенез кишечника, легких и мочевого пузыря у крыс при пероральном введении на стадии постинициации [17]. При этом одновременное введение с карциногенами вело к подавлению карциногенеза, возможно, посредством супрессии ферментов фазы I, таких как цитохром P450 1A2 (CYP1A2), который индуцируется карциногенными гетероциклическими аминами. Кроме того, повышение глутатион-S-трансферазы также могло играть роль в пост-инициационной супрессии рака языка. Интрагастральное введение коровьего ЛФ обладало антиметастазным эффектом у мышей с карциномой 26 (Co 26Lu), причем повышался локальный и системный иммунитет. Клинические испытания выявили, что перорально вводимый коровий ЛФ ингибирует рост аденомных полипов и может уменьшать риск карциногенеза кишечника у людей [17–18].

Интригующей особенностью биологической активности ЛФ является подтверждаемая рядом данных (*in vivo* и *in vitro*) противополож-

ность его эффектов на нормальные и раковые клетки, а именно стимуляция нормальных и подавление раковых клеток. В разработке новых методов профилактики и терапии различных заболеваний особое место занимает направление, основанное на использовании регуляторных факторов, вырабатываемых в самих тканях организма. Эти сигнальные молекулы запускают механизмы, препятствующие патологическим изменениям и стимулирующие восстановительные, регенеративные процессы. В этом плане имеются основания полагать, что в организме вырабатываются регуляторные вещества, активизирующие систему противораковой защиты и даже блокирующие процесс биологического старения. Согласно предложенной О.В. Квитко развитой теории омоложения [19–23], огромные различия в темпе старения, продолжительности жизни видов и скорости развития онкологических заболеваний определяются тем, что более долговечными и онкорезистентными являются организмы с продолжительными периодами физического развития и роста, когда активно продуцируются сигнальные молекулы (в частности, морфогенетические белки), которые наряду с управлением процессами морфогенеза и роста активизируют эпигенетические процессы восстановления физиологически оптимального спектра экспрессии генов [19–23].

Возможность одновременного участия одних и тех же белков в различных процессах подтверждается явлением плейотропии – полифункциональности, т.е. участия одного и того же гена или белка в разных функциях [24]. ЛФ является многофункциональным белком, обладающим аффинностью к различным клеточным рецепторам [25–27]. При этом в исследованиях на культурах костных клеток получены данные об участии ЛФ в регуляции морфогенеза и роста костной ткани [28–29], что позволяет считать его одним из морфогенетических факторов. ЛФ синтезируется и накапливается во вторичных гранулах нейтрофилов и присутствует в плазме крови, что обеспечивает его доставку к различным тканям организма.

К положительным эффектам ЛФ при введении в организм относятся подавление микробных инфекций, стимулирование им-

мунитета, противовоспалительное действие, противоопухолевая активность и ускорение заживления ран.

Особый интерес к использованию ЛФ определяется возможностью его получения из такого доступного источника, как молоко животных, в котором он содержится в значительных количествах. При этом уже реализована возможность производства человеческого ЛФ из молока трансгенных животных, в частности коз, что демонстрируется результатами выполнения союзной программы БелРосТрансген [30]. Это открывает перспективу создания высокоэффективных и биологически безопасных лекарственных средств и пищевых продуктов на основе ЛФ человека [30].

Материалы и методы

Работа выполнялась на клетках стандартной линии рака легкого А549 и полученной нами иммортализованной линии клеток из эмбриональных фибробластов человека.

Культуры клеток высевали в ростовой среде, включающей среду RPMI (для линии А549) или DMEM (для линий иммортализованных фибробластов человека), 10% эмбриональной сыворотки телят (ЭТС) и антибиотики (пенициллин и стрептомицин).

Для выполнения экспериментов по количественному анализу и компьютерной видеомикроскопии монослойные клеточные культуры трипсинизировали (для отделения от сосуда клетки снимаются 0,25%-ным раствором трипсина), суспендировали с помощью пипетки в ростовой среде, подсчитывали концентрацию клеток в камере Горяева и высевали клетки при низкой плотности (порядка 10 клеток на 1 мм² ростовой поверхности) в сосуды Карреля со специально изготовленными стеклянными вкладышами (рис. 1). Вкладыши имеют размеры 25 × 10 × 1 мм и разделены на квадратные (1 × 1 мм) участки бороздками шириной 0,2 мм и глубиной 0,05 мм. Бороздки препятствуют перемещению клеток из одного квадрата в другой, что обеспечивает удобство анализа роста культуры.

При помощи шприца в сосуд Карреля добавляли CO₂ (5% объема сосуда). После добавления CO₂ с помощью шприца сосуды Карреля герметически закупоривали резиновыми

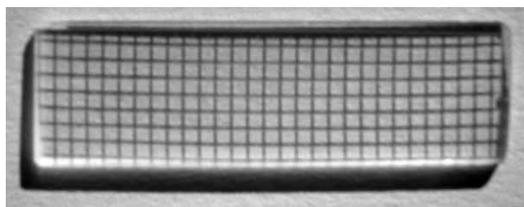


Рис. 1. Стеклоный вкладыш для культивирования клеток

пробками. Клетки культивировали в термостате (37 °С). После распластывания основной части клеток (после 2 дней культивирования) выполняли компьютерное фотографирование клеток на стеклянных вкладышах (по 30 квадратных участков).

Растворы лактоферрина в культуральной среде (10 мг/мл) пропускали через 0,2 мкм фильтр и хранили при 4 °С. Для создания концентрации 1000 мкг/мл из сосуда отбирали 300 мкл среды и вносили 300 мкл концентрата. Соответственно, для создания концентраций 100 и 10 мкг/мл вносили и отбирали 30 и 3 мкл концентрата и среды соответственно, после чего добавляли во флаконы новую порцию углекислого газа и закупоривали флаконы резиновыми пробками. В контрольных сосудах открывали резиновую пробку и вносили новую порцию углекислого газа. В экспериментах с повторным добавлением ЛФ проводили полную смену культуральной среды.

Через различные интервалы времени выполняли компьютерное фотографирование тех же участков клеточных культур, что и перед добавлением раствора ЛФ (в опытных вариантах) либо воды (в контроле).

Фотографирование выбранных участков культур производилось с помощью компьютерного видеокomплекса «Цитомир», изготовленного совместно с НТЦ «Микроскопия» ОАО «Оптоэлектронные системы» ГНПО «Планар» в рамках проекта подпрограммы «Научные приборы» ГКНТ Республики Беларусь.

Результаты и обсуждение

Исследование эффектов рекомбинантного лактоферрина человека на линию рака легкого А549

В первом эксперименте на клетках линии рака легкого А549 после 2, 5 и 8 дней воздействия лактоферрина не было обнаружено достоверных отличий от контроля по количеству клеток (табл. 1). Не было также обнаружено каких-либо качественных изменений. Все культуры достигли высокой плотности клеток, при этом клетки в основном принимали округлую форму.

В следующем эксперименте после 8 дней, прошедших после первого внесения ЛФ, провели смену среды с повторным добавлением лактоферрина в тех же концентрациях. После повторного введения лактоферрина в ряде участков культур количество клеток уменьшалось, а оставшиеся клетки увеличивались в размере и по морфологии отличались от клеток в контроле, приобретая более веретеновидную форму (рис. 2). Но в целом, как видно из табл. 2, не было обнаружено заметного снижения темпов пролиферации раковых клеток в опытных культурах по сравнению с контролем.

Таблица 1

Число клеток линии рака легкого А549 при однократном введении лактоферрина

Концентрация ЛФ, мкг/мл	Время после внесения ЛФ, дни			
	0	2	5	8
0 (контроль 1)	176	720	2300	2462
0 (контроль 2)	283	799	2435	2495
10	180	557	2245	2405
10	240	730	2335	2445
100	179	481	1500	1855
100	227	710	2050	2128
1000	200	574	1805	1988
1000	215	609	2145	2200

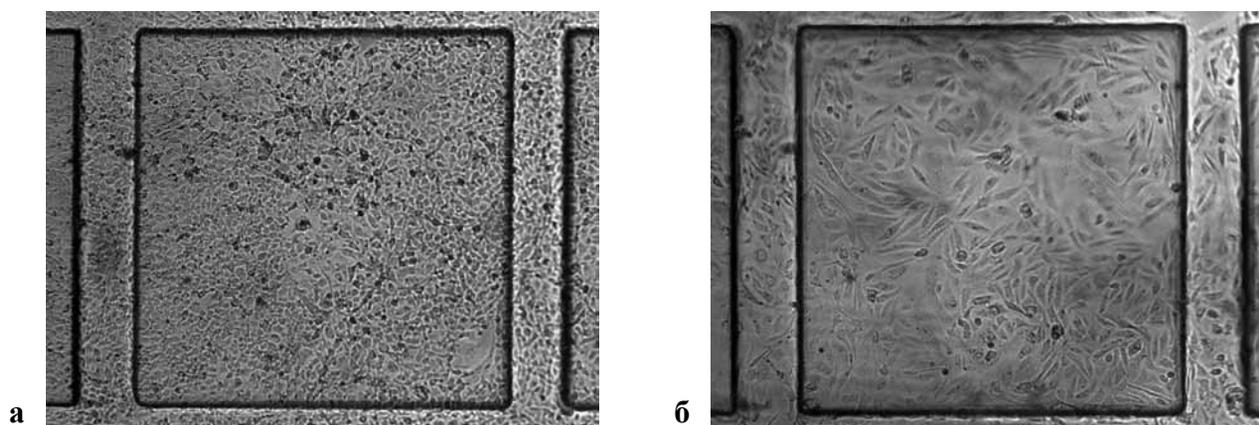


Рис. 2. Участок клеточной культуры линии рака легкого А549: а) в контроле; б) после двукратного введения лактоферрина в концентрации 100 мкг/мл

Таблица 2

Число клеток линии рака легкого А549 при двукратном введении лактоферрина

Концентрация ЛФ, мкг\мл	Время после внесения ЛФ, дни			
	0	7	14	21
0 (контроль 1)	720	2323	3223	3390
0 (контроль 2)	311	1470	2370	2520
10	432	1387	1745	2265
10	351	1615	1670	2030
100	377	1360	1723	1995
100	422	1783	2185	2345
1000	413	1440	2220	2625
1000	389	1060	1605	2050

Исследование эффектов рекомбинантного лактоферрина человека на культуру иммортализованной линии фибробластов человека

Так как в предыдущих экспериментах по 1- и 2-кратному введению лактоферрина в культуру линии А549 не удалось выявить заметных эффектов по ингибции пролиферации раковых клеток, в следующих экспериментах с иммортализованной линией фибробластов человека культуры применяли 3-кратное введение лактоферрина. После клеточного посева в культуральную среду, содержащую лактоферрин, этот белок также вводился в культуры на 12-й и 20-й дни после первого внесения препарата.

В этих экспериментах на поздних сроках культивирования в культурах с концентрациями лактоферрина 100 и 1000 мкг/мл количество клеток резко уменьшилось (табл. 3–4). Ингибирующий эффект возрастал с увеличением концентрации. Во всех культурах с кон-

центрацией лактоферрина 1000 мкг/мл, а также в одной культуре с концентрацией 100 мкг/мл произошла полная гибель клеток. В остальных культурах с концентрацией 100 мкг/мл наблюдалось резкое уменьшение числа клеток на фоне продолжающегося увеличения числа клеток в вариантах с концентрацией 10 мкг/мл и контроле.

Таким образом, обнаружено дозозависимое ингибирующее действие рекомбинантного лактоферрина на культуру иммортализованной линии фибробластов человека при продолжительном культивировании клеток после трехкратного введения препарата. Ингибирующий эффект лактоферрина на линию раковых клеток А549 обнаружен не был, что может быть обусловлено недостаточной продолжительностью культивирования клеток в среде, содержащей лактоферрин.

По видимому, особенностью действия регуляторного белка лактоферрина на трансформированные клетки является мягкий, растянутый

Таблица 3

Число клеток иммортализованной линии фибробластов человека при трехкратном введении лактоферрина

Концентрация ЛФ, мкг\мл	Время после внесения ЛФ, дни									
	0	5	9	12	16	19	23	27	31	33
0 (контроль 1)	349	1560	2579	4300	8760	15786	16250	16340	16230	15950
0 (контроль 2)	676	2130	5205	9570	15580	15140	14980	15360	15120	14350
10	520	1850	3260	5950	10300	11950	12980	13560	14000	14530
100	511	2400	4980	7980	10960	11360	11400	9780	2230	59
100	545	1239	4250	7670	9345	9980	10260	5600	1450	108
1000	501	974	1912	5141	7379	9670	5980	670	0	0
1000	623	1206	3548	7322	9766	10834	5517	1435	24	0

Таблица 4

Число клеток иммортализованной линии фибробластов человека при трехкратном введении лактоферрина

Концентрация ЛФ, мкг\мл	Время после внесения ЛФ, дни									
	0	4	7	11	14	17	21	24	28	31
0 (контроль 1)	301	928	2161	3950	7290	11080	12321	13370	14370	14650
0 (контроль 2)	167	411	1236	2670	5540	8740	12780	14252	15674	15987
10	233	876	2296	4765	7780	9650	10450	10870	11328	11604
10	179	458	1297	3100	6789	8320	9620	10352	11670	12453
100	243	674	1612	3270	5650	6200	6290	5530	2200	120
100	181	398	1078	2980	4800	5660	5900	4320	1290	0
1000	269	732	1689	2980	4550	4907	2970	1780	510	0
1000	179	347	986	1765	1930	1730	301	0	0	0

во времени ингибирующий эффект. В то же время, в литературных данных сообщается о возможном стимулирующем действии лактоферрина на нормальные клетки. Это свойство выгодно отличало бы противораковые препараты на основе лактоферрина от традиционных химиопрепаратов, действующих достаточно быстро, но обладающих нежелательными побочными эффектами на нормальные клетки. Следовательно, в будущих исследованиях целесообразно изучить влияние лактоферрина на культуру нормальных клеток, а также на смешанную культуру нормальных и раковых клеток. Противораковый эффект данного белка на смешанных культурах может быть особенно выраженным за счет синергии подавления раковых клеток и стимулирования нормальных.

Заключение

Изучено воздействие различных концентраций лактоферрина из молока трансгенных коз на пролиферацию и апоптоз клеток линии

рака легкого А549 и иммортализованной клеточной линии эмбриональных фибробластов человека.

В экспериментах по изучению действия лактоферрина на клеточную линию рака легкого А549 при одно- и двукратном введении препарата не было обнаружено заметного снижения темпов пролиферации. Тем не менее, в некоторых участках культур на поздних сроках культивирования наблюдалось уменьшение числа клеток, а также изменение клеточной морфологии. Отсутствие значительного ингибирующего эффекта лактоферрина в экспериментах на клетках раковой линии А549 может быть обусловлено недостаточно продолжительным воздействием лактоферрина.

При изучении действия лактоферрина на иммортализованной линии эмбриональных фибробластов человека при трехкратном введении в культуру лактоферрин уменьшал количество клеток на поздних сроках культивирования в концентрациях 100 и 1000 мкг/

мл, причем ингибирующий эффект возрастал с концентрацией препарата вплоть до полной гибели клеток.

Анализ литературных данных демонстрирует неоднозначность действия лактоферрина на разные типы клеток, вплоть до противоположных эффектов. Это свидетельствует о перспективности изучения эффектов лактоферрина в направлении поиска благоприятных ингибирующих либо стимулирующих воздействий. Представляется целесообразным исследовать влияние лактоферрина на культуру нормальных клеток, а также на смешанную культуру нормальных и раковых (иммортиализированных) клеток. Ожидается, что противораковый эффект данного белка на смешанных культурах может быть особенно выраженным за счет синергии подавления трансформированных и стимулирования нормальных клеток.

Список использованных источников

1. Levay, P.F. Lactoferrin: a general review / P.F. Levay, M. Viljoen // *Haematologica*. – 1995. – Vol. 80. – P. 252–267.
2. Nancy, C. Disorders of Iron Metabolism / C. Nancy, M.D. Andrews // *N Engl J Med*. – 1999. – Vol. 341. – P. 1986–1995.
3. Vogel, H.J. Lactoferrin, a bird's eye view / H.J. Vogel // *Biochem Cell Biol*. – 2012. – Vol. 90, № 3. – P. 233–244.
4. Sanchez, L. Biological role of lactoferrin / L. Sanchez, M. Calvo, J.H. Brock // *Arch. Dis. Child*. – 1992. – Vol. 67. – P. 657–661.
5. Baldwin, D.A. The effect of human serum transferrin and milk lactoferrin on hydroxyl radical formation from superoxide and hydrogen peroxide / D.A. Baldwin, E.R. Jenny, P. Aisen // *J. Biol. Chem*. – 1984. – Vol. 259. – P. 13 391–13 394.
6. Restricted spatiotemporal expression of lactoferrin during murine embryonic development / P.P. Ward [et al.] // *Endocrinology*. – 1999. – Vol. 140. – P. 1852–1860.
7. Masson, P.L. An ironbinding protein common to many external secretions / P.L. Masson, J.F. Heremans, C. Dive // *Clinica Chimica Acta*. – 1966. – Vol. 14. – P. 735–739.
8. Levay, P.F. Lactoferrin: a general review / P.F. Levay, M. Viljoen // *Haematologica*. – 1995. – Vol. 80. – P. 252–267.
9. Isolation of a lactoferrin cDNA clone and its expression in human breast cancer / T. Campbell [et al.] // *Br. J. Cancer*. – 1992. – Vol. 65. – P. 19–26.
10. Polymorphism and altered methylation of the lactoferrin gene in normal leukocytes, leukemic cells and breast cancer / T.J. Panella [et al.] // *Cancer Res*. – 1991. – Vol. 51. – P. 3037–3043.
11. Lactoferrin expression in human breast cancer / S. Penco [et al.] // *Cancer Biochem. Biophys*. – 1999. – Vol. 17. – P. 163–178.
12. Methylation and expression of the lactoferrin gene in human tissues and cancer cells / C. Teng [et al.] // *Biometals*. – 2004. – Vol. 17. – P. 317–323.
13. Expression and prognostic value of lactoferrin mRNA isoforms in human breast cancer / M. Benaissa [et al.] // *Int. J. Cancer*. – 2005. – Vol. 114. – P. 299–306.
14. Siebert, P.D. Identification of an alternative form of human lactoferrin mRNA that is expressed differentially in normal tissues and tumor-derived cell lines / P.D. Siebert, B.C. Huang // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1997. – Vol. 94. – P. 2198–2203.
15. Methylation and expression of the lactoferrin gene in human tissues and cancer cells / C. Teng [et al.] // *Biometals*. – 2004. – Vol. 17, № 3. – P. 317–323.
16. Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice / J. Bezault [et al.] // *Cancer Res*. – 1994. – Vol. 54. – P. 2310–2312.
17. Cancer prevention by bovine lactoferrin and underlying mechanisms – a review of experimental and clinical studies / H. Tsuda [et al.] // *Biochem. Cell Biol*. – 2002. – Vol. 80, № 1. – P. 131–136.
18. Cancer prevention by bovine lactoferrin: from animal studies to human trial / H. Tsuda [et al.] // *Biometals*. – 2010. – Vol. 23, № 3. – P. 399–409.
19. Квитко, О.В. Развитие доминанты как механизм антистарения / О.В. Квитко // *Альманах геронтологии и гериатрии*. – 2005. – Т. 4. – С. 73–77.
20. Квитко, О.В. Генетика долголетия / О.В. Квитко // *Наука и инновации*. – 2009. – Т. 8, № 78. – С. 18–20.
21. Kvitko, O. Signalling pathways and rejuvenation: risks and opportunities // 11th Scientific Symposium of LVMH Recherche, 2011, 27th October, London UK. – P. 30–33.

22. Квитко О.В. Сознание и геном: на пороге «золотого века» / О.В. Квитко // Наука и инновации. – 2012. – Т. 12, № 118. – С. 11–13.
23. Эпигенетическое омоложение клеток и регенеративная медицина / О.В. Квитко [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. – Минск, 2011. – Т. 12. – С. 136–145.
24. Pleiotropy [Electronic resource] / Wikipedia.org. – Mode of access: <http://en.wikipedia.org/wiki/Pleiotropy>. – Date of access: 25.04.2014.
25. Ward, P.P. Lactoferrin and host defense / P.P. Ward, S. Uribe-Luna, O.M. Conneely // Biochem. Cell Biol. – 2002. – Vol. 95. – P. 102.
26. Suzuki, Y.A. Characterization of mammalian receptors for lactoferrin / Y.A. Suzuki, B. Lonnerdal // Biochem. Cell Biol. – 2002. – Vol. 80. – P. 75–80.
27. Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein involved in the modulation of the inflammatory process / S. Baveye [et al.] // Clin. Chem. Lab. Med. – 1999. – Vol. 37. – P. 281–286.
28. Lactoferrin reduces in vitro osteoclast differentiation and resorbing activity / F. Lorget [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2002. – Vol. 296. – P. 261–266.
29. Lactoferrin is a potent regulator of bone cell activity and increases bone formation *in vivo* / J. Cornish [et al.] // Endocrinology. – 2004. – Vol. 145. – P. 4366–4374.
30. Союзная программа «БелРосТрансген-2» [Электронный ресурс] / Национальный научно-технический портал Республики Беларусь. – 19.02.2013. – Режим доступа: <http://scienceportal.org.by/news/d5fec50c0c65b2e4.html>. – Дата доступа: 25.04.2014.

Дата поступления статьи 5 мая 2014 г.

CHIP-SEQ ДАННЫЕ И ИХ АНАЛИЗ

Обзорная статья

¹Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук
Российская Федерация, 630090, г. Новосибирск, пр-т ак. Лаврентьева, 10

²Новосибирский государственный университет
Российская Федерация, 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, д. 2.

Секвенирование геномов и исследование регуляции транскрипции

С начала 2000-х годов, после секвенирования первых полных геномов, в молекулярной генетике произошла технологическая революция, связанная с появлением экспрессионных микрочипов высокой плотности и технологий высокопроизводительного секвенирования ДНК. В настоящее время становится возможной детальная функциональная аннотация регуляторных геномных последовательностей по экспериментальным данным, полученным в результате массового параллельного секвенирования ДНК [30]. Кроме определения положения и структуры белок-кодирующих генов, полногеномная аннотация включает описание некодирующих РНК, выделение регуляторных районов генов, исследование хромосомных аномалий и однонуклеотидных полиморфизмов, определение функции белков, предсказание их вторичной и пространственной структуры [9].

Исследование механизмов регуляции транскрипции генов – самостоятельная фундаментальная задача. Определяющую роль в контроле экспрессии генов на уровне транскрипции играют транскрипционные факторы – белки, специфически взаимодействующие с регуляторными районами генов и белками транскрипционной машины. Экспрессия гена в значительной степени определяется и другими условиями, такими как состояние хроматина в данном районе генома, уровень метилирования ДНК, плотность нуклеосомной упаковки ДНК [14]. Компьютерные модели транскрипции необходимы как для успешного предсказания особенностей экспрессии генов, так и для выполнения прикладных исследований, например, реконструкции регуляторных сетей, создания генетических конструкций с задан-

ными свойствами, исследования механизмов заболеваний, канцерогенеза, поиска мишеней для лекарств, токсикологических исследований, выявления ключевых биомаркеров [30].

Реконструировать генные сети (регуляторные контуры) взаимодействующих генов транскрипционных факторов можно через определение их сайтов связывания в промоторах генов – мишеней воздействия этих транскрипционных факторов. Регуляторные районы групп коэкспрессирующихся генов зачастую имеют общие черты организации, что выражается в наличии регуляторных паттернов (цис-регуляторных модулей), состоящих из устойчивых сочетаний сайтов связывания нескольких транскрипционных факторов различных типов и других нуклеотидных мотивов [4]. Выявление и анализ таких регуляторных паттернов является основой для построения обобщенных моделей регуляторных районов группы коэкспрессирующихся генов.

В настоящее время накоплен колоссальный объем данных в области регуляции экспрессии генов эукариот, наблюдается их непрерывный рост как первичных данных, доступных в частности в репозитории данных GEO NCBI (Gene Expression Omnibus) (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/). Все большую актуальность приобретает формализация описания механизмов регуляции транскрипции и разработка на этой основе методов интеграции гетерогенной информации об особенностях регуляции экспрессии генов, использующая как технологии определения сайтов связывания транскрипционных факторов в геноме, так и оценки уровней экспрессии генов на микрочипах.

Период после завершения проекта «Геном человека» принято называть «постгеномной эрой». Черновой вариант генома был опубликован в 2001 г., окончательным завершением

проекта можно считать опубликование первичной структуры последней из секвенированных хромосом – хромосомы I [11]. Однако действительно фундаментальные изменения в молекулярной биологии были внесены не столько данными о нуклеотидных последовательностях первых секвенированных геномов, сколько появлением новых революционных методов секвенирования ДНК. Первые геномные проекты выполнялись с использованием капиллярных секвенаторов, т.е. технологии первого поколения. Секвенирование по Сэнгеру дает последовательности очень высокого качества и достаточно длинные (500–800 п.н.) для эффективной сборки в протяженные контиги, однако требует очень высоких затрат времени, денег и высококвалифицированного труда. Радикальное удешевление секвенирования ДНК явилось результатом появления приборов второго поколения, основанных на принципах массового параллельного секвенирования. Совершенствование этих систем привело к огромному повышению производительности приборов и одновременно фантастическому падению стоимости их работы. Так, расчетная стоимость ресеквенирования человеческого генома, по данным National Human Genome Research Institute (<http://genome.gov/sequencingcosts>), за период с 2001 по 2011 год упала со 100 миллионов долларов до 10 тысяч, т.е. в среднем снижалась в 1000 раз за год. Заметим, что данная стоимость рассчитана для крупных геномных центров, фактически представляющих из себя хорошо организованное индустриальное производство. К 2014 году эта стоимость составила 3–5 тысяч долларов. Доступность секвенирования, помимо огромного вклада в фундаментальные научные исследования, позволяет использовать секвенирование индивидуального генома как стандартный диагностический тест, что исключительно важно для медицинских приложений.

Ключевой особенностью технологий второго поколения является получение молекулярных колоний на твердофазном носителе с помощью ПЦР с одной молекулы и дальнейшее параллельное одновременное секвенирование сотен миллионов и миллиардов этих кластеров в ходе синтеза новых цепей. В настоящий момент существуют четыре технологии второго поколения, каждая из них реализована в нескольких вариантах приборов. Технология 454 от фирмы

Roche основана на пиросеквенировании с оптической детекцией света, испускаемого люциферазой. SOLiD от Applied Biosystems выполняет секвенирование путем последовательного лигирования флюоресцентно меченых олигонуклеотидов. Технология Illumina основана на использовании обратимой терминации синтеза флюоресцентно мечеными нуклеотидами. Прибор IonTorrent от Applied Biosystems работает на принципе полупроводникового секвенирования с детекцией изменений pH при синтезе новых цепей ДНК внутри микролунок чипа. Эти технологии обеспечивают секвенирование достаточно коротких фрагментов ДНК – 75 п.н. у SOLiD, 100–300 у Illumina HiSeq, 200–400 для IonTorrent, 400–700 п.н. для Roche FLX Titanium [3]. Огромные объемы данных, представленные короткими последовательностями, ставят технически более сложные задачи биоинформационного анализа, выравнивания, картирования и сборки коротких последовательностей ДНК. Будет справедливо сказать, что на сегодняшний день корректный анализ данных секвенирования ДНК является большей проблемой, чем их получение.

Серьезные надежды в течение десятилетия возлагались на разработку третьего поколения приборов – «одномолекулярных» секвенаторов. Их ключевой особенностью является отсутствие ПЦР в процессе пробоподготовки, при этом секвенируется каждая единичная молекула ДНК, а не кластеры идентичных копий. Это является достоинством метода, поскольку именно наличие ПЦР во время пробоподготовки вызывает большую часть системных ошибок, характерных для секвенаторов второго поколения. За последние годы было анонсировано несколько десятков фирм, готовых предложить работающую модель одномолекулярного секвенатора в самое ближайшее время. Однако эти обещания так и не претворились в реальность. Представителем реально работающих в настоящее время одномолекулярных секвенаторов является прибор фирмы Pacific Biosciences (PacBio), основанный на детекции включения в синтезируемую цепь флуоресцентно меченых нуклеотидов. Его особенностью является возможность непрерывного чтения молекул ДНК длиной до нескольких тысяч нуклеотидов при крайне невысокой его точности – более 10% ошибок

[28]. В 2014 году продемонстрирована работоспособность в реальных условиях прибора Oxford Technologies Nanopore, основанного на прямой детекции оснований ДНК при прохождении через нанопоры в электронном чипе и позволяющего сверхдлинные чтения (до 50 т.п.н.). Для использования в геномных проектах любая технология должна обладать тремя условиями: высокая производительность, низкая себестоимость работы и высокая точность прочтения. К сожалению, ни один одномолекулярный секвенатор до сих пор не обладает одновременно всеми тремя достоинствами и поэтому на настоящий момент безнадежно проигрывает приборам второго поколения. Однако большая длина чтения (десятки т.п.н.) и отсутствие ПЦР делают эти технологии крайне полезными для узкого круга задач.

Технология иммунопреципитации хроматина

Среди методов, позволяющих изучать связывание транскрипционных факторов (ТФ) с ДНК, наибольшими перспективами для полногеномных исследований обладает метод иммунопреципитации хроматина (Chromatin Immunoprecipitation – ChIP) с последующим секвенированием, ChIP-seq.

Процедура ChIP-seq на первом этапе требует фиксации контактирующих молекул ДНК и белков в клетке с помощью формальдегида, что вызывает образование ковалентных сшивок между ДНК и белками. Далее хроматин дробится ультразвуком на фрагменты (существует термин «соникация» или, дословно «озвучивание» хроматина). Альтернативно разделение ДНК может выполняться с помощью разрезания ферментами рестрикции. Затем с помощью иммунопреципитации со специфическими антителами выделяется ДНК, с которыми физически связан интересующий исследователя белок. Белковая фракция отмывается, а ДНК (относительно короткие фрагменты не более нескольких сотен оснований) направляется на секвенирование с помощью имеющегося оборудования массового параллельного секвенирования ДНК (Roche 454, Illumina или SOLiD).

Прочитывание ДНК выполняется не для всей последовательности экстрагированного фрагмента, составляющей до нескольких сотен нуклеотидов, а для крайнего участка – от 20 до 75 п.о. Если выполняется лигирование концов фрагмента ДНК, они могут секвенироваться попарно (так называемые парные концы, или PET – Paired End Tags). На рис. 1 представлена схема определения кластеров

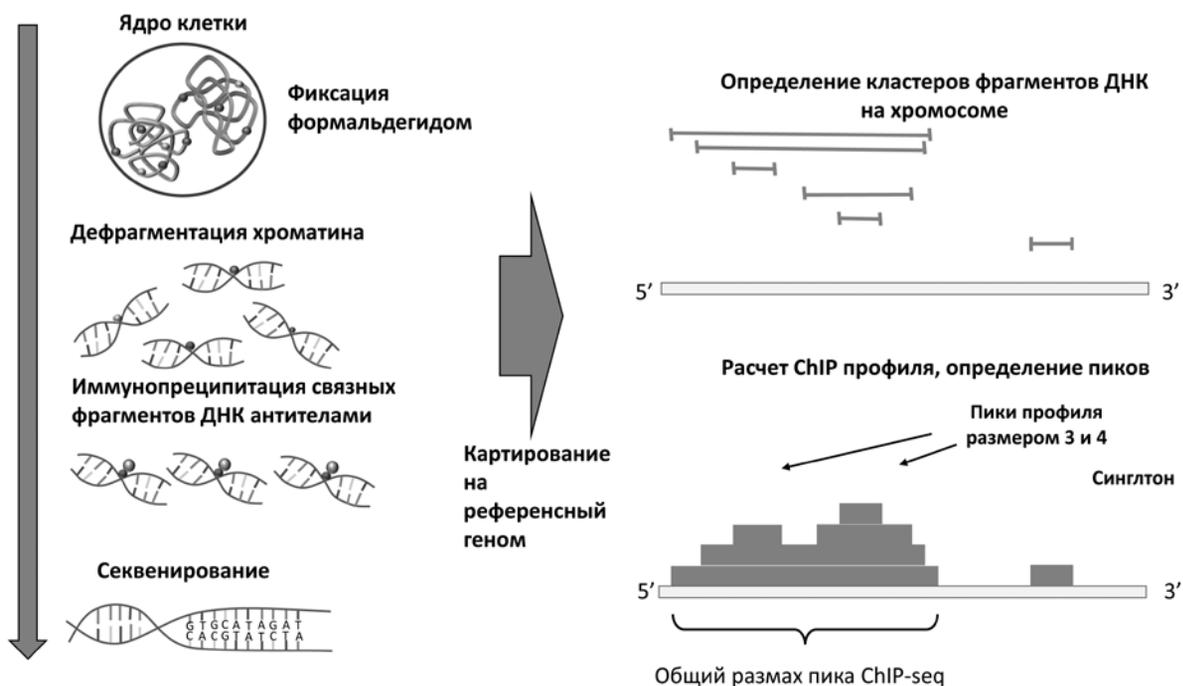


Рис. 1. Схема иммунопреципитации хроматина, картирования фрагментов ДНК и пример получаемого ступенчатого профиля ChIP-seq

фрагментов ДНК на хромосоме для парных фрагментов (парных концов метода ChIP-PET) и для одиночных фрагментов. Задача картирования секвенированных фрагментов (прочтений, или «ридов» (от. англ. reads)) технически выполняется с помощью выравнивания и быстрого поиска совпадений с последовательностями ДНК хромосом генома.

Картирование секвенированных последовательностей технически требует до нескольких часов машинного времени на персональном компьютере для достаточно больших по размеру геномов эукариот. Для ее решения применяются компьютерные методы оптимизации выравнивания и быстрого поиска совпадений в нуклеотидных последовательностях. Существует набор программ картирования прочтений для форматов данных Illumina и форматов цветовой кодировки SOLiD (см. обзор программ на SEQanswers, <http://seqanswers.com>). Далее, используя координаты секвенированных фрагментов на хромосомах рефе-

ренсного генома, строится так называемый геномный профиль и выполняется его анализ (рис. 1 и рис. 2).

При построении профиля связывания координаты прочтений удлиняются до размера исходного фрагмента ДНК (150–200 нт) и получается «лестница» или «ступени» фрагментов, наложенных друг на друга в геномных координатах. При использовании парных концов длина фрагментов определяется точно, при одностороннем секвенировании длина фрагмента оценивается по среднему значению (например, 150 нт). Из наложенных друг на друга фрагментов строится ступенчатый профиль. Затем определяются пики такого геномного профиля. Пик – это наиболее высокая точка локального профиля. Пик более вероятно содержит сайт связывания транскрипционного фактора, чем окружающий геномный район, поскольку все фрагменты ДНК, составляющие «ступени» пика, должны быть связаны с белком в ChIP-эксперименте.

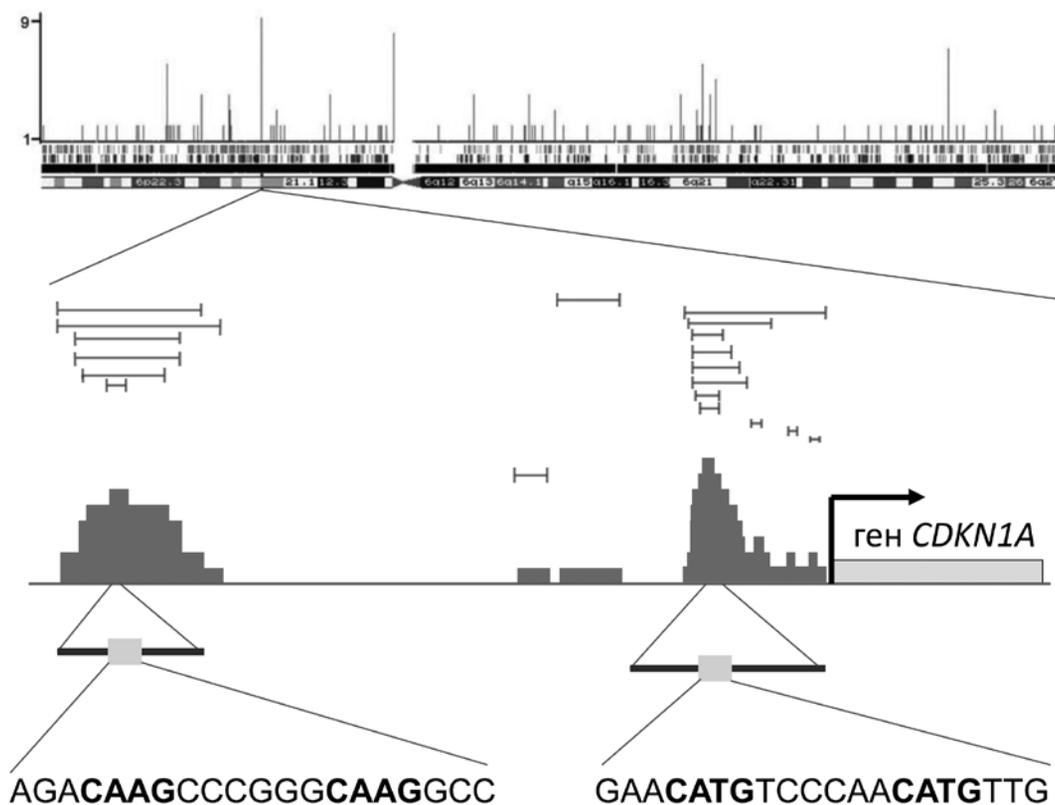


Рис. 2. Полногеномное представление сайтов связывания транскрипционного фактора p53 на хромосоме 6 человека (вверху) и выделенный стрелкой район генома, содержащий ген *CDKN1A* и его 5' район в большем масштабе. Два участка профиля, сформированного фрагментами ДНК, прошедшими иммунопреципитацию, образуют пики, содержащие узнаваемый консенсусный мотив связывания p53 AGACATGCCAGACATGCCS.

Внизу показана частотная матрица мотива связывания, восстановленная по полногеномным данным [31]

Исторически метод иммунопреципитации хроматина предназначался для анализа взаимодействий белок-ДНК на единичной или ограниченной выборке данных (несколько промоторных участков). Массовое использование олигонуклеотидных микрочипов позволило усовершенствовать технологию и получать гибридационный сигнал связывания исследуемой последовательности с заранее подготовленными пробами. Технология получила название ChIP-on-chip, или ChIP-chip (то есть хроматин-иммунопреципитация на микрочипе) [7, 12]. Такой анализ возможен для достаточно больших наборов проб, включая, например, отдельные хромосомы или все промоторные районы генов, известные в геноме. Существуют варианты микрочиповых технологий для определения связывания с белками в специализированных вариантах – метод DamID (использующий белок Dam – DNA adenine methyltransferase), метод DIP-seq (DNA ImmunoPrecipitation) для исследования связывания с ДНК без хроматина [26].

Общий набор методов выделения сайтов связывания, основанных на иммунопреципитации, по-английски называют “ChIP” [7]. Технология ChIP-seq применялась для поиска сайтов связывания ТФ мыши [4], человека [5, 31, 32], анализа модификаций гистонов в различных тканях [14].

Исследование профиля ChIP-seq требует специализированных компьютерных программ и ориентированных на конкретную задачу методов, в зависимости от технологий секвенирования (коррекция на специфические ошибки), размера и особенностей генома (наличие повторенных последовательностей, детали аннотации – от компактного, хорошо изученного генома дрожжей до большого по размеру генома человека и, например, геномов растений, где нет референсной последовательности). Первичные данные секвенирования поступают в формате bed-файлов либо в FASTA формате для картирования на геном (тысячи и миллионы последовательностей).

В результате стандартного эксперимента ChIP-seq [4] по извлечению белка, специфически связанного с ДНК, получается набор последовательностей, упорядоченное расположение которых в геноме (в хромосомных координатах) дает ступенчатый профиль. Короткие

секвенированные фрагменты уже на геномной карте удлиняют до 150–300 нуклеотидов, что в среднем соответствует размеру экстрагированной в ChIP-seq ДНК (и соответствует размеру одной-двух нуклеосом). Заметим, что практически достаточно секвенировать первые 25–35 нуклеотидов, чтобы однозначно найти координаты фрагмента в геноме.

Образующийся численный профиль связывания вдоль хромосомы (одномерная координата) содержит интересующие исследователя места в геноме – участки (сайты) связывания с белком. Их видно (например, при увеличении масштаба в геномном браузере) как пики (горки) профиля (рис. 2). Пики получаются в результате перекрытия нескольких фрагментов (графически как наложенные друг на друга полосы в одномерных координатах хромосомы). Пик профиля как сигнал можно математически описать координатами начала и конца участка, указать высоту пика, положение вершины (саммита), оценить вероятность получения пика по случайным причинам. При близком расположении нескольких участков, связанных с исследуемым белком, пик может иметь несколько вершин (мультимодальный пик), что задает неоднозначность при выборе позиции специфического сайта.

Секвенирование фрагментов ДНК может выполняться с двух сторон с использованием технологии секвенирования парных концов, что позволяет более точно картировать сайты [6]. Отметим, что относительно недавние работы 2005–2007 годов использовавшие секвенирование парных концов (PET – Paired End Tags), что вошло в название ChIP-PET, включали клонирование выделенных фрагментов ДНК как необходимый технологический шаг перед секвенированием [31, 32]. Клонирование увеличивало общее время эксперимента и вело к частичной потере данных (при неравномерном клонировании фрагментов ДНК по длине). В настоящее время метод ChIP-seq, основанный на прямом секвенировании полученных после иммунопреципитации фрагментов ДНК, включает возможность использования протокола секвенирования парных концов [6, 22].

В целом, секвенирование обладает рядом преимуществ по сравнению с микрочиповыми технологиями исследования связывания белков в регуляторных районах ChIP-on-chip [12].

Прежде всего, результатом ChIP-seq является картина полногеномного распределения сайтов связывания транскрипционных факторов (ССТФ). Кроме того, полученный результат свободен от предварительной селекции исследуемых районов, которые могут существенно исказить конечный результат. Результатом ChIP-seq являются не только относительные уровни сигнала связывания, а конкретные участки последовательностей ДНК, что дает больше возможностей для теоретического анализа и точного определения сайтов.

Метод иммунопреципитации хроматина с последующим секвенированием широко используется для получения картины полногеномного распределения сайтов связывания различных транскрипционных факторов [4, 5]. Более 160 профилей связывания для генома человека представлены в данных проекта ENCODE [9], десятки профилей ChIP-seq доступны для генома мыши, других модельных организмов.

Обработка найденного набора сайтов связывания исследуемого транскрипционного фактора, найденных в геноме при помощи ChIP-seq, требует разработки компьютерных программ сравнения положения таких сайтов и расположения генов в геноме, определения потенциальных генов мишеней действия этого транскрипционного фактора [6]. Еще более сложной становится задача описания регуляторных районов генов и определения генов-мишеней при анализе данных трехмерных контактов. Данными являются уже не линейные координаты последовательностей, а двумерные – наборы пар контактов и матрицы контактов.

Математическая задача анализа профиля секвенирования

В типичной задаче анализа профиля ChIP-seq геном человека (размер около 3 Гб) разделен по хромосомам от 20 до 200 Мб; профили строятся для каждой хромосомы, стандартно каждой позиции нуклеотида ставится в соответствие высота профиля, линейно увеличивая размер файла в зависимости от размера генома. Однако при более компактной записи профиля, размер файла чуть меньше, порядка 100 Мб. При дополнительной аннотации размеры файлов значительно увеличиваются,

фактически на пределе возможностей работы стандартного персонального компьютера. Для других организмов геном может иметь как меньший (дрожжи, нематода), так и существенно больший размер (геномы растений, таких как пшеница); практически объем данных ChIP-seq составляет от 100 Мб до 1 Гб.

В результате секвенирования ChIP-seq имеем набор коротких фрагментов (прочтений, или «ридов»), размером от 25 до 100 нуклеотидов. Эти фрагменты распределены по геному неравномерно. Размер библиотек (наборов данных секвенирования, получаемых в одном эксперименте) колеблется от 2 до 40 миллионов таких коротких последовательностей. Для анализа мотива связывания транскрипционного фактора используют нуклеотидные последовательности пиков геномного профиля (см. рис. 3), сравнение с известными базами данных сайтов связывания [19].

Уникальность (однозначность) картирования короткой последовательности на геном представляет особую проблему анализа данных. Если в геноме был повтор (два участка ДНК в разных местах генома, достаточно длинных, скажем, 100 нт и более), и наш короткий фрагмент ДНК попал в повтор, то мы не можем его однозначно (уникально) картировать. Пример таких затруднений – картирование регуляторных сайтов для генов, имеющих псевдогены. Общее свойство протяженных геномных последовательностей – иметь участки, недоступные для однозначного картирования короткими фрагментами из-за длинных совершенных повторов. Существуют термины «картируемость» (mappability) и «уникальность» (uniqueome) – как часть генома, которая однозначно (уникально) определяется короткими фрагментами заданной длины [21]. Для каждой длины секвенированных ридов существует своя «уникальность» – например, для фрагментов размером 50 нт некартируемых участков гораздо меньше, чем для фрагментов 25 нт. Наборы таких карт можно рассчитать, существуют и готовые разметки «уникальности» для нескольких референсных геномов, в частности геномов человека и мыши [21]. Отметим, что программы разметки «уникальности» требуют высокопроизводительных компьютерных вычислений – фактически, поиска всех повторов в геноме.

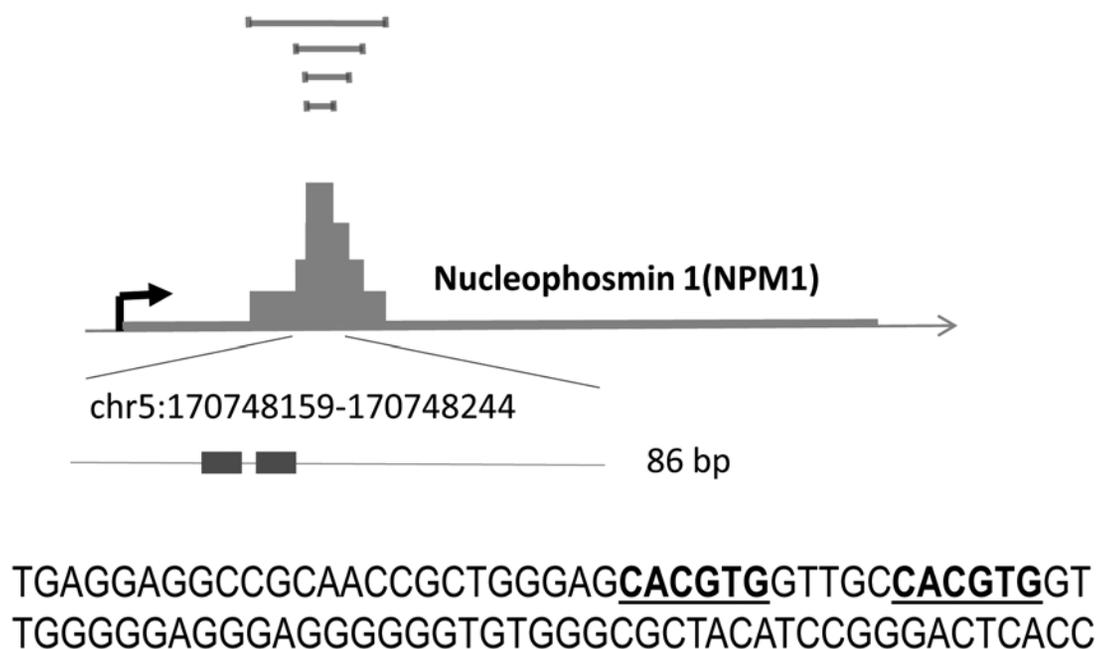


Рис. 3. Расположение секвенированных парных концов ChIP-PET и анализ нуклеотидной последовательности связывания Мус. Известный сайт связывания Мус в первом интроне гена *NPM1* определен кластером PET-4. Показаны перекрывающиеся PET-фрагменты (вверху), образующийся ступенчатый профиль (пик) пересечения фрагментов, координаты в геноме человека. Внизу показана 86 нт последовательность, соответствующая пересечению всех фрагментов ДНК в кластере с выделенными элементами CACGTG, соответствующими каноническому E-боксу [32]

Поскольку эксперимент ChIP-seq проводится на пуле (большом наборе) клеток, каждый акт связывания, представленный фрагментом ДНК, не зависит от других последовательностей. Перекрывание фрагментов в геноме в районе пика подтверждает специфичность связывания. Истинные (специфичные) пики профиля имеют большую высоту (сформированы большим числом фрагментов ДНК), что можно показать статистически. Для определения порогового значения пика, когда с уверенностью можно говорить про специфичность, удобно упорядочить все полученные пики по высоте и рассчитать число пиков в зависимости от высоты (рис. 4). Полученное распределение всегда очень неравномерно – большинство пиков имеет небольшую высоту, затем число высоких пиков быстро (почти экспоненциально) убывает.

Задача определения набора пиков в геноме решается статистически с помощью сравнения экспериментально полученного распределения набора пиков к ожидаемому по случайным причинам (рис. 4). Был предложен компьютерный алгоритм определения пиков профиля и их последующей фильтрации от «шума» и ошибок

секвенирования, основанный на статистике распределения числа сайтов в геноме в зависимости от высоты пика ChIP-seq и сравнении специфического профиля с контрольным. Контрольное секвенирование выполняется после разделения геномной ДНК ультразвуком без антител, или с иммунопреципитацией к неспецифическому белку – GFP или IgG. Такой подход в разных вариантах реализован в компьютерных программах определения пиков профиля ChIP-seq [33].

Распределение вероятности наблюдения $P_{obs}(X=m)$ сайтов (пиков профиля) X фиксированной высоты m может быть представлено как взвешенная сумма специфического и неспецифического распределений:

$$P_{obs}(X=m) = \alpha * P_{sp}(X=m) + (1 - \alpha) * P_{ns}(X=m),$$

где P_{obs} – функция вероятности наблюдаемого распределения встречаемости ChIP пиков;

X – пики;

$m=1,2,3,\dots$ – высота пика; P_{sp} – вероятность специфических пиков;

$0 < \alpha < 1$ – доля специфических пиков в общем распределении пиков в геноме;

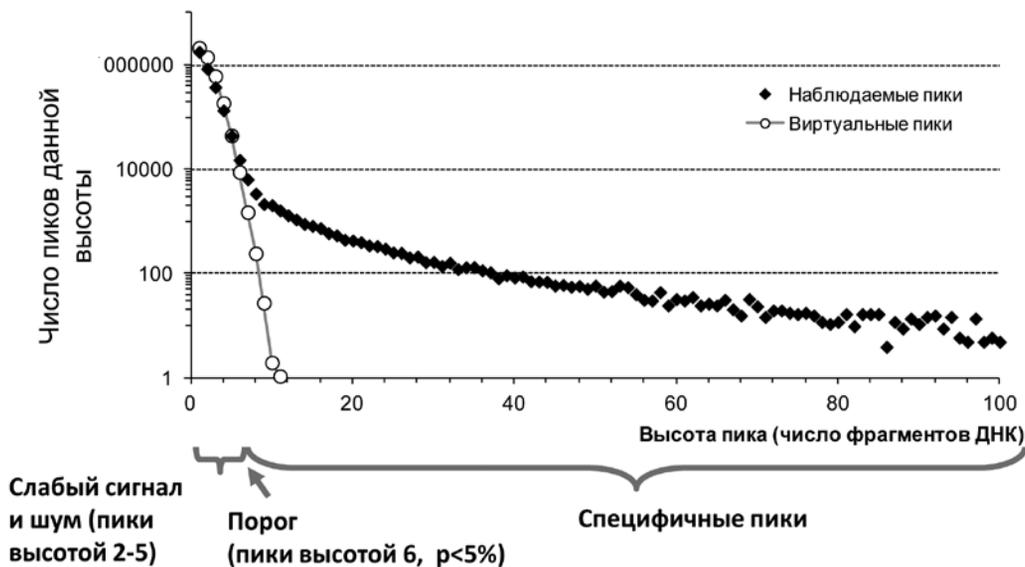


Рис. 4. Распределение числа сайтов в геноме в зависимости от высоты пика ChIP-seq (для связывания ТФ Nanog мыши) [4]

P_{ns} – вероятность неспецифичных пиков (шумовой сигнал) в общем распределении пиков по профилю в геноме [18].

На основе экспериментальных ChIP-данных мы можем построить эмпирическую функцию распределения пиков в геномном профиле. Распределение числа специфичных пиков P_{sp} в зависимости от их высоты может быть промоделировано с помощью распределения Пуассона или распределения Парето, начиная с большой высоты пика, где шумового сигнала уже нет (например, с $m=10$ на рис. 4) [18]. Неспецифичное распределение P_{ns} может быть оценено с помощью компьютерной симуляции по появлению кластеров (пиков) при случайном (равномерном) распределении прочтений (секвенированных фрагментов ДНК) вдоль хромосомы. Разработанная компьютерная модель симуляции случайных пиков в геноме требует достаточно интенсивных пересчетов (несколько часов работы на персональном компьютере). Позднее в качестве контроля использовалось число пиков неспецифичного секвенирования (без иммунопреципитации) всей доступной ДНК или с использованием неспецифичных белков (таких как GFP, IgG). Специфичность связывания P_{sp} зависит от силы связывания ДНК с белком, что может быть подтверждено далее с помощью выборочного тестирования методом qPCR [14].

Для опубликованных ТФ в геноме получается от 1000 до 20 000 сайтов связывания, подтвержденных (выборочно) независимым тестированием [4, 14]. Стандартно получалось около 5000 сайтов (мест на хромосоме), каждый со своей высотой пика, характеризующей его «силу связывания». Сила связывания определяется по короткой последовательности ДНК – те самые 6–8 нт мотива связывания ТФ. Показано, что высота пика профиля ChIP-seq в геномном эксперименте должна коррелировать со связыванием в отдельных проверочных экспериментах qPCR.

Наиболее высокие пики геномного профиля, как правило, содержат мотив сайта связывания – последовательность, похожую на известную консенсусную последовательность ДНК (рис. 2). Мотив может допускать несоответствия в нуклеотидной последовательности, описываемые позиционной весовой матрицей для данного сайта. Такие весовые матрицы для многих транскрипционных факторов есть в базах данных, таких как TRANSFAC, TRRD (<http://www.mgs.bionet.nsc.ru/mgs/gnw/trrd/>), JASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>) (результаты «одиночных» разрозненных экспериментов или более старых технологий, собранные по литературе). Высокий процент содержания в пиках ChIP-seq исследуемого мотива, оцененного весовой матрицей, показывает, что положение пиков определено правильно.

Другая оценка качества сигнала связывания в профиле ChIP-seq – это относительная высота пика по отношению к контролю – отношение числа специфических фрагментов ДНК в исследуемой точке генома к числу неспецифических, полученном в контрольном эксперименте секвенирования без иммунопреципитации [2]. Контрольный профиль получают в результате эксперимента по секвенированию в тех же условиях, но без специфических белков («пустой» прогон). Обычно требуют превышения высоты пика по отношению к контролю в 3–5 раз. Используя контрольный профиль секвенирования можно получить оценку ошибки ложного предсказания для каждого пика, FDR (False Discovery Rate).

Есть ряд опубликованных программ анализа пиков ChIP-seq, например GLITR (GLobal Identifier of Target Regions), MACS [33], HPeak, PeakFinder, GLITR, QuEST, CisGenome, USeq и PICS (см. для обзора [2, 19]).

Для картирования длинных фрагментов ДНК хорошо подходят программы MUMmer и BLAT. Для картирования коротких фрагментов ДНК набор программ достаточно велик: MAQ (Mapping and Assembly with Quality), SOAP (Short Oligonucleotide Alignment) [24], использующая индексы для представления референсной последовательности; программа ELAND, ориентированная на стандарт данных Illumina (<http://www.illumina.com/systems.ilmn>).

Распространены также программы Bowtie, использующая индекс Burrows–Wheeler индекс (BWT) [20], SeqMap, RMAP, ZOOM [2]. Сегодня необходимо развитие методов для более широкого их использования для геномов с недостаточной аннотацией.

В целом, задачи компьютерной обработки полногеномных данных секвенирования можно разделить на следующие направления:

- первичная фильтрация данных, картирование;
- анализ профилей секвенирования ДНК, сопряженного с иммунопреципитацией (ChIP-seq) с выделением как точечных участков связывания, так и протяженных участков (модификации гистонов);
- разметка сайтов связывания нуклеосом по нуклеотидной последовательности;

- интеграция данных секвенирования между собой (кластеры сайтов связывания транскрипционных факторов);
- интеграция данных с геномной аннотацией (определение генов-мишеней).

Программа HPeak (Hidden Markov model Peak) использует скрытые марковские модели для определения геномных участков, контактирующих с белками. Используется статистическая модель, учитывающая реалистичное распределение вероятностей для прочтений ДНК.

Программа MACS [33] исходно была ориентирована на технологию Illumina Solexa (данные Solexa Genome Analyzer). Программа использует фрагменты («риды») в противоположных ориентациях, чтобы определить так называемый размер сдвига – близость между «ридами», содержащими сайты связывания. Преимуществом MACS является локальное моделирование «шумового», или контрольного секвенирования с помощью распределения Пуассона по участкам хромосом (участки, размер которых задается пользователем, тысяча – десять тысяч пар нуклеотидов).

Рассмотрим пример серии экспериментов ChIP-seq для одного и того же типа клеток. Масштабное исследование профилей связывания 13 различных транскрипционных факторов (ТФ) в геноме мыши было выполнено в работе [4] на эмбриональных стволовых клетках. Исследовались ТФ, значимые для поддержания плюрипотентности и развития организма, такие как Oct4, Nanog, Sox2. Использовалась платформа секвенирования Illumina Solexa. Для каждого транскрипционного фактора было получено от 5 до 12 миллионов последовательностей, в среднем 65% из них картировались однозначно на референсный геном мыши, что соответствует стандартам экспериментов ChIP-seq. Для контроля использовалась иммунопреципитация к неспецифическому белку GFP (Green Fluorescent Protein). Определение значимых кластеров (пиков) профиля выполняется с помощью сравнения профилей с контрольным секвенированием и последующей нормализацией. Обычно получается несколько тысяч сайтов на геном для одного транскрипционного фактора. Так, в работе Chen et al. было определено от одной до 40 тысяч сайтов связывания для этих 13 ТФ [4].

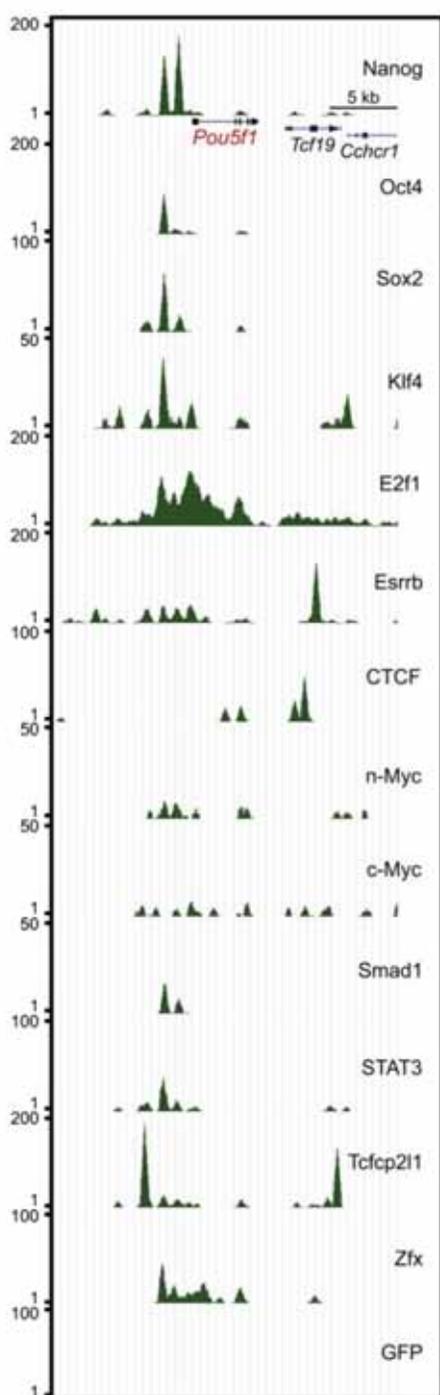


Рис. 5. Профили связывания 13 различных транскрипционных факторов в геноме мыши для гена *Pou5f1*. Внизу представлен профиль контрольного секвенирования (для неспецифического белка GFP) [4]

Для сильно «зашумленных» данных или недостаточно глубокого секвенирования могут быть специфические статистические проблемы. Например, при неглубоком секвенировании (0,5–1 миллион ридов вместо 5–10 миллионов),

геном человека не покрыт полностью секвенированными фрагментами и трудно гарантировать, что все сайты в эксперименте выявлены. Ранее считалось (эмпирически), что даже 5 миллионов фрагментов уже достаточно, чтобы выявить все сайты в геноме [4]. Сейчас стандарт эксперимента ChIP-seq – это 20–40 миллионов прочтений ДНК. Можно показать статистически, что при дальнейшем увеличении глубины секвенирования просто повышается порог высоты пика при выделении пиков из профиля, и уже не детектируются новые сайты в геноме (в данных условиях эксперимента, фиксированного антитела), что обосновывает достаточность использования меньшего числа прочтений [4].

Следует отметить, что описанные возможности применимы для геномов хорошо изученных организмов, геномы которых не только известны, но и хорошо аннотированы (человек, мышь, *A. thaliana*, нематода *C. elegans* и др.). Однако существует большое число важных для изучения организмов, геномы которых могут быть плохо аннотированы (рыбка *D. rerio*) или вообще отсутствовать (слабо изученные геномы, например, паразитические черви). Тем не менее, для модельных медицинских и биотехнологических задач изучение этих организмов очень актуально, и эксперименты ChIP-seq выполнимы.

Полногеномное секвенирование коротких фрагментов без специфического белка может использоваться и для определения нуклеосомной упаковки (позиционирования всех нуклеосом) в полном геноме эукариот [15]. Исследовалась, в частности, нуклеосомная упаковка в геноме дрожжей и ее взаимодействие с сайтами связывания транскрипционных факторов. При этом анализ профиля секвенирования ДНК (прямое секвенирование нуклеосомных фрагментов без иммунопреципитации) интегрировался с данными о сайтах связывания, определенными первоначально посредством ChIP-chip технологии [15].

Секвенирование и трехмерная структура хромосом

Проблема анализа трехмерной структуры генома активно исследуется различными методами, использующими геномное секвенирование. Интересно отметить технологии Hi-C [8] и ChIA-PET [10], позволяющие получать

информацию о пространственной структуре хромосом через секвенирование. Метод Hi-C [8] клетки без специфических взаимодействий, не используя иммунопреципитацию. Метод показывает, как молекула ДНК, линейный размер которой многократно превышает размеры интерфазного ядра, компактизуется и помещается в малый объем ядра. Hi-C основан на технологии 3C (Chromosome Conformation Capture) и технологиях массового параллельного секвенирования. 3C – метод, который позволяет исследовать пространственное взаимодействие двух специфичных районов генома. Методика измеряет вероятность взаимодействия двух районов генома в большой популяции клеток (10^5 – 10^6). На первом этапе формальдегидом фиксируют белок-белковые, белок-ДНК и белок-РНК-взаимодействия за счет образования ковалентных связей. Затем ДНК фрагментируется с помощью рестриктаз. После этого проводят лигирование (соединения концов двухцепочечной ДНК) в условия разбавления. В таких условиях лигируются только концы молекул ДНК, сближенных в пространстве. Далее нужные молекулы выделяются (обычно с помощью мечения биотином). Затем такие лигированные концы секвенируются, и полученные парные последовательности ДНК картируются на геном, аналогично описанным процедурам ChIP-seq. Создается библиотека (большой набор) попарно взаимодействующих молекул ДНК. Исследование таких парных контактов представляет новую задачу биоинформатики.

Исследование Hi-C показало, что укладка молекул ДНК в ядре достигается путем упаковки по модели «фрактальной глобулы». Такая модель позволяет избежать большого числа сложных узлов. Однако в значительной степени остаются неисследованными важнейшие вопросы о хромосомных контактах промоторов генов в трехмерном пространстве ядра клетки и расположения функциональных групп генов в хромосомных доменах, которые важны в контексте аннотации и исследования генных сетей.

Рассматриваются пространственные домены на хромосоме. Такие домены выделяются при обработке данных Hi-C, и уже представлены в ряде интернет-доступных баз данных (например 3DGD [29] и Mouse Encode Project at Ren Lab [27]).

Метод ChIA-PET (Chromatin Immunoprecipitation Analysis – Paired End Tags) [10, 23], использующий иммунопреципитацию хроматина, позволяет определять контактирующие участки хромосом, контакты которых опосредованы белками или белковыми комплексами. Отличие от метода Hi-C состоит в том, что в процедуру обработки хроматиновых контактов добавлена стадия иммунопреципитации, так же как в методе ChIP-seq. Таким образом, определяется структура хромосомных контактов, опосредованных специфическим белком (например, транскрипционным фактором ER α или фактором CTCF), а не все контакты хромосом. Метод ChIA-PET предназначен для исследования хромосомных петель, прежде всего между регуляторными районами генов, контактов между удаленными энхансерами и промоторами. Контактующие участки хромосом выделяются более специфично, в связи с исследуемым белком – транскрипционным фактором, поэтому этот метод можно считать расширением метода ChIP-seq.

Для белка ER α – рецептора эстрогенов – выполнялся анализ карт контактов на хромосомах по методу ChIA-PET [10]. Данные хромосомных контактов, полученные с помощью полногеномного секвенирования, независимо подтверждались с помощью экспериментов по технологии 3C (Chromosome conformation capture) и флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH).

Эксперименты ChIA-PET по определению хромосомных контактов в ядре клетки, опосредованных уже не отдельным транскрипционным фактором, а целым транскрипционным комплексом РНК полимеразы II представлены в работе [23]. Был проведен компьютерный анализ распределения хромосомных контактов относительно генов и относительно участков генома, ассоциированных с модификациями хроматина (модификации гистона H3, связанные с открытым состоянием хроматина) [17]. Предложена классификация моделей промоторных, энхансерных и мультигенных контактов, опосредованных комплексом РНК полимеразы II [23], включающая классы: базальный промотор, промотор-энхансер и мультигенный локус. Модель базального промотора включает только локальные петли ДНК в промоторе,

без удаленных взаимодействий. Модель одиночного гена включает только петли в районе гена – между энхансером и промотором, возможно между 5' и 3' районами гена, но без других белок-кодирующих генов. И, наконец, мультигенная модель включает сразу несколько генов, расположенных рядом друг с другом и контактирующих промоторными районами. Введен термин «хромоперон» (chromoperon) или «хромосомный оперон». В этой модели также возможен контакт промоторов с удаленными энхансерами.

Для связывания транскрипционных факторов в геноме важно состояние хроматина, его открытость (отсутствие нуклеосомной упаковки), доступность ДНК. Маркеры модификаций гистонов, прежде всего гистона H3, модификации лизина в позициях 4, 14, 36, включающие метилирование и ацетилирование, связаны с доступностью ДНК и могут быть определены экспериментально также по технологии ChIP-seq [14]. Связь хромосомных контактов и модификаций хроматина (метилирование и ацетилирование) гистонов (гистона H3) исследовалась статистически

в масштабе генома [23]. Исследование контактов хромосом, опосредованных комплексом РНК полимеразы RNA Pol II в культурах клеток человека, подтвердило ассоциацию с сайтами связывания факторов транскрипции и модификациями хроматина [23]. Было показано статистически, что хроматин в контактирующих участках открыт – гистоны имеют маркеры модификации активной транскрипции – H3K4me3, H3K9ac (соответствуют пикам профиля ChIP-seq), в то же время модификации репрессии транскрипции H3K27me3 не имеют пиков.

Экспериментально полученные профили модификаций хроматина позволяют предсказывать сайты связывания транскрипционных факторов в полногеномной шкале, что было показано детально для связывания рецептора эстрогенов ER α [14]. Более того, уже методом ChIA-PET показано, что ассоциации хромосомных контактов, опосредованных белком ER α , также связаны с открытым (активированным) состоянием хроматина, в частности модификациями H3K4me3, H3K4me1 [10] в линии клеток MCF-7.

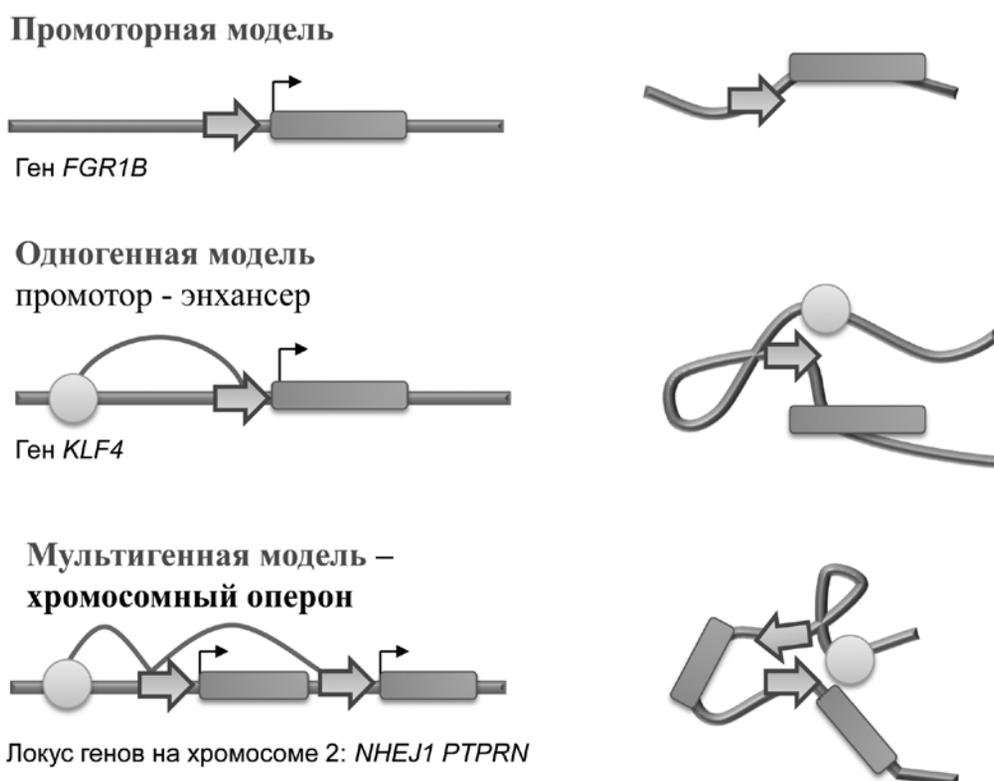


Рис. 6. ChIA-PET. Модели промоторных, энхансерных и мультигенных контактов, опосредованных комплексом РНК полимеразы II [23]

Заключение и обсуждение

Технологии секвенирования, сопряженные с иммунопреципитацией хроматина (ChIP), позволяют исследовать механизмы регуляции транскрипции в масштабе генома эукариот [7, 30]. В данном обзоре кратко представлены особенности моделирования такого рода полногеномных данных, связанные с анализом профилей ChIP-seq, выделением сайтов связывания и дальнейшим анализом их нуклеотидных последовательностей [4, 14, 23]. Технология ChIP-seq позволяет исследовать профили связывания различных транскрипционных факторов и ко-факторов, сопоставлять карты их взаимодействий с профилями модификаций хроматина и нуклеосомной упаковки [14]. Расширение технологии секвенирования ДНК на пространственно-контактирующие участки хромосом (ChIA-PET) позволяет изучать уже пространственную организацию генома в ядре клетки, также в связи с регуляцией транскрипции генов [23]. Рост объемов таких гетерогенных экспериментальных данных требует разработки новых биоинформационных решений [2, 19].

Авторы благодарны Y.Ruan и G.Li за научное обсуждение. Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта ИЦиГ СО РАН VI.61.1.2, Интеграционного проект СО РАН №130, РФФИ 14-04-01906.

Список использованных источников

- 3С-методы в исследованиях пространственной организации генома / Н.Р. Баттулин [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2012. – Т. 16. № 4/2. – С. 872–876.
- Practical Guidelines for the Comprehensive Analysis of ChIP-seq Data / T. Bailey [et al.] // PLoS Comput Biol. – 2013. – 9(11):e1003326.
- Barba, M. Historical Perspective, Development and Applications of Next-Generation Sequencing in Plant Virology / M. Barba, H. Czosnek, A. Hadidi // Viruses. – 2014. – Vol. 6. – P. 106–136.
- Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells / X. Chen [et al.] // Cell. – 2008. – Vol. 133(6). P. 1106–1117.
- A genome-wide RNAi screen identifies PRDM14 as a regulator of POU5F1 and human embryonic stem cell identity / N.-Y. Chia [et al.] // Nature. – 2010. – Vol. 468(7321). – P. 316–320.
- dPeak: high resolution identification of transcription factor binding sites from PET and SET ChIP-Seq data / D. Chung [et al.] // PLoS Comput Biol. – 2013. – 9(10):e1003246.
- Collas, P. Chop it, ChIP it, check it: the current status of chromatin immunoprecipitation / P. Collas, J.A. Dahl // Front Biosci. – 2008. – Vol. 13. – P. 929–943.
- Dekker, J. Exploring the three-dimensional organization of genomes: interpreting chromatin interaction data / J. Dekker, M.A. Marti-Renom, L.A. Mirny // Nat Rev Genet. – 2013. – Vol. 14(6). P. 390–403.
- An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome / ENCODE Project Consortium B.E. Bernstein [et al.] // Nature. – 2012. – Vol. 489(7414). – P. 57–74.
- An oestrogen-receptor-alpha-bound human chromatin interactome / M.J. Fullwood [et al.] // Nature. – 2009. – Vol. 462(7269). – P. 58–64.
- The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1 / S.G. Gregory [et al.] // Nature. – 2006. – Vol. 441. – P. 315–321.
- ChIP-chip versus ChIP-seq: lessons for experimental design and data analysis / J.W. Ho [et al.] // BMC Genomics. – 2011. – 28;12:134.
- Iterative correction of Hi-C data reveals hallmarks of chromosome organization / M. Imakaev [et al.] // Nat Methods. – 2012. – Vol. 9(10). – P. 999–1003.
- Integrative model of genomic factors for determining binding site selection by estrogen receptor α / R. Joseph [et al.] // Mol Syst Biol. – 2010. – Vol. 6. – P. 456.
- The DNA-encoded nucleosome organization of a eukaryotic genome / N. Kaplan [et al.] // Nature. – 2009. – Vol. 458(7236). – P. 362–366.
- Kedes, L. The new date, new format, new goals and new sponsor of the Archon Genomics X PRIZE Competition / L. Kedes, G. Campy // Nature Genetics. – 2011. – Vol. 43. – P. 1055–1058.
- Interactome maps of mouse gene regulatory domains reveal basic principles of transcriptional regulation / K.R. Kieffer-Kwon [et al.] // Cell. – 2013. – Vol. 155(7). – P. 1507–1520.
- Computational analysis and modeling of genome-scale avidity distribution of transcription factor binding sites in chip-pet experiments

- / V.A. Kuznetsov [et al.] // Genome Inform. – 2007. – Vol. 19. – P. 83–94.
19. A practical comparison of methods for detecting transcription factor binding sites in ChIP-seq experiments / T.D. Laajala [et al.] // BMC Genomics. – 2009. – Vol. 10. – P. 618.
20. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome / B. Langmead [et al.] // Genome Biol. – 2009. – Vol. 10(3):R25.
21. Lee, H. Genomic dark matter: the reliability of short read mapping illustrated by the genome mappability score / H. Lee, M.C. Schatz // Bioinformatics. – 2012. – Vol. 28(16). P. 2097–3105.
22. Differential motif enrichment analysis of paired ChIP-seq experiments / T. Lesluyes [et al.] // BMC Genomics. – 2014. – Vol. 15(1). – P. 752.
23. Extensive promoter-centered chromatin interactions provide a topological basis for transcription regulation / G. Li [et al.] // Cell. – 2012. – Vol. 148(1–2). – P. 84–98.
24. SOAP: short oligonucleotide alignment program / R. Li [et al.] // Bioinformatics. – 2008. – Vol. 24. – P. 713–714.
25. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome / E. Lieberman-Aiden [et al.] // Science. – 2009. – Vol. 326(5950). – P. 289–293.
26. DIP-chip: rapid and accurate determination of DNA-binding specificity / X. Liu [et al.] // Genome Res. – 2005. – Vol. 15(3). – P. 421–427.
27. Mouse Encode Project at Ren Lab [Электронный ресурс] / Yue Lab at Penn State. – Mode of access: <http://yuelab.org/hi-c/>.
28. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion torrent, pacific biosciences and illumina MiSeq sequencers / M. Quail [et al.] // BMC Genomics. – 2012. – Vol. 13. – P. 341–354.
29. Three dimensional genome database (3DGD) [Электронный ресурс] – Mode of access: <http://3dgd.biosino.org/protein/page/view-Pattern.jsp>.
30. Tucker, T. Massively parallel sequencing: the next big thing in genetic medicine / T. Tucker, M. Marra, J.M. Friedman // Am J Hum Genet. – 2009. – Vol. 85(2). – P. 142–154.
31. A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome / C.L. Wei [et al.] // Cell. – 2006. – P. 124(1). – P. 207–219.
32. Global mapping of c-Myc binding sites and target gene networks in human B cells / K.I. Zeller [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. – 2006. – Vol. 103. – P. 17 834–17 839.
33. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS) / Y. Zhang [et al.] // Genome Biol. – 2008. – Vol. 9(9):R137.

Дата поступления статьи 22 сентября 2014 г.

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ТЕЛОМЕР МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Обзорная статья

Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук
Российская Федерация, 630090, г. Новосибирск, пр-т ак. Лаврентьева, 10

ДНК-овый компонент хромосом эукариот представлен линейной молекулой ДНК. В связи с этим для сохранения стабильности генома клетка должна при каждом делении обеспечивать полную репликацию ДНК, а концы хромосом не должны распознаваться как двуниевые разрывы. Если концы хромосом будут опознаваться как двуниевые разрывы, то их «репарация» приведет к слиянию хромосом, формированию дицентриков и вступлению их в цикл перестроек, получивший название «мост-разрыв-новое слияние-мост» [1]. Возникновение даже одного разрыва может приводить к серии перестроек, затрагивающих многие хромосомы [2, 3].

Впервые на способность ДНК-полимеразы полностью реплицировать 5' конец отстающей в ходе репликации нити ДНК после деградации РНК-праймаера обратил внимание русский ученый Алексей Матвеевич Оловников в своей теории маргинотомии [4, 5]. Его предположение, что для полной репликации концов хромосом необходим специальный механизм, вскоре получило экспериментальное подтверждение. За открытие механизма репликации теломерных районов хромосом в 2009 г. Элизабет Блэкберн, Кэрол Грейдер и Джеку Шостаку была присуждена Нобелевская премия в области физиологии и медицины.

К решению проблемы стабильности хромосом и кариотипа в целом Генри Меллер подошел с другой стороны. Изучая влияние рентгеновского облучения на хромосомы *Drosophila melanogaster*, он обнаружил, что хромосомы, потерявшие терминальные районы, сливаются, образуя хромосомные перестройки. В связи с этим он предположил, что концевой участок хромосомы содержит «ген», необходимый для «запечатывания конца хромосомы» и назвал его теломерой от греческого «телос» – конец и «мерос» – часть (цит. по [6]). К аналогичному

выводу пришла также Барбара Мак Клинтон, изучая стабилизацию разорванных концов хромосом кукурузы [7].

Структура теломер

Теломеры представляют собой нуклеопротеиновые структуры, ДНК-овый компонент которых у человека и других млекопитающих на отстающей в ходе репликации нити состоит из повторяющейся шестерки нуклеотидов $-(TTAGGG)_n$ [8, 9]. Теломеры человека содержат 5–15 т.п.н. теломерного повтора [10]. В состав теломер входит также теломерная РНК (TERRA, Telomeric Repeat-containing RNA).

G-обогащенная нить ДНК теломеры заканчивается однониевым 3' концом. У человека он содержит от 30 до 600 оснований [11, 12]. Существующее единообразие в ориентации теломерных повторов предотвращает слияние теломер в результате гомологичной рекомбинации ДНК. Если же она происходит, то это приводит к изменению длины теломер, их укорочению или удлинению [13]. Эта особенность строения концов хромосом лежит в основе того, что Робертсоновские слияния хромосом с сохранением теломерной ДНК относительно редки и могут происходить лишь в U-образной конфигурации хромосом [14]. Недавно было показано, что нарушения в теломерах могут негативно сказываться на целостности околотеломерных районов, особенно рДНК, часто непосредственно прилегающей к теломерам акроцентриков, и, таким образом, способствовать формированию Робертсоновских транслокаций с потерей теломерной ДНК в том числе у человека [15]. Источником же хромосомной нестабильности является негомологичная рекомбинация теломерных повторов [16, 17].

Изучение структурной организации теломеры показало, что при правильной конфигурации однониевой конец загибается назад и об-

разуется большая теломерная петлю (t-петлю). При этом он внедряется в двунитевой район теломеры и замещает одну из теломерных нитей. В результате образуется малая теломерная петля (D-петля) (рис. 1). Образующаяся структура «кэпирует» («запечатывает») конец хромосомы, так что он перестает распознаваться как двунитевой разрыв. t- и D-петли были визуализированы при электронно-микроскопическом анализе теломерной ДНК [22, 23]. Как правило, в клетке кэпированы не все хромосомы. Более длинные теломеры кэпированы гораздо чаще, чем короткие [20, 21].

Важным компонентом теломеры является специальный защитный комплекс shelterin, состоящий у человека из 6 белковых субъединиц: TRF1 (Telomere Repeat Factor 1), TRF2 (Telomere Repeat Factor 2), TIN2 (TRF1-interacting nuclear factor 2), TPP1 (TriPeptidyl-Peptidase 1), POT1 (Protection Telomeres Protein 1) и RAP1 (RAS-related Protein 1). Он контролирует структуру теломер и предотвращает гомологичную и негомологичную рекомбинацию. Было показано, что непосредственно с двунитевой теломерной ДНК связаны факторы TRF1 и TRF2. С ними связан фактор TIN2, который через TPP1 может сформировать мост с POT1. POT1 – это единственный белок shelterin комплекса, который связывается непосредственно с однонитевым 3' концом [22]. Shelterin комплекс

мышей содержит два паролога POT1: POT1a и POT1b, выполняющие такие же функции, как POT1 в shelterin человека [23]. TRF2 также взаимодействует с RAP1, а TRF1 – с POT1 через TPP1. Шесть компонентов shelterin образуют как бы два теломерных компартмента. В одном компоненты прямо или через другие компоненты связаны только с двунитевой частью теломеры, а в другом – как с двунитевой частью, так и с однонитевым концом (рис. 2).

Рассмотрим коротко основные функции компонентов shelterin. TRF1 осуществляет непосредственно контроль над длиной теломер, способствуя репликации теломерной ДНК [24]. TRF2 участвует в репрессии ATM-сигнального пути и негомологичной рекомбинации, предотвращает концевые слияния хромосом. RAP1 является ключевым фактором при репрессии гомологичной рекомбинации и может предотвращать теломеразо-независимое удлинение теломер. В клетках человека RAP1 функционирует в тандеме с TRF2 [25], однако у мышей он независим от TRF2 [26]. TPP1/POT1 также необходимы для репрессии гомологичной рекомбинации. Таким образом, целостность теломер и их функционирование напрямую связано с shelterin комплексом, концентрацией на теломерах отдельных компонентов комплекса и взаимодействием этих компонентов друг с другом. Хотя shelterin изучен только у двух ви-

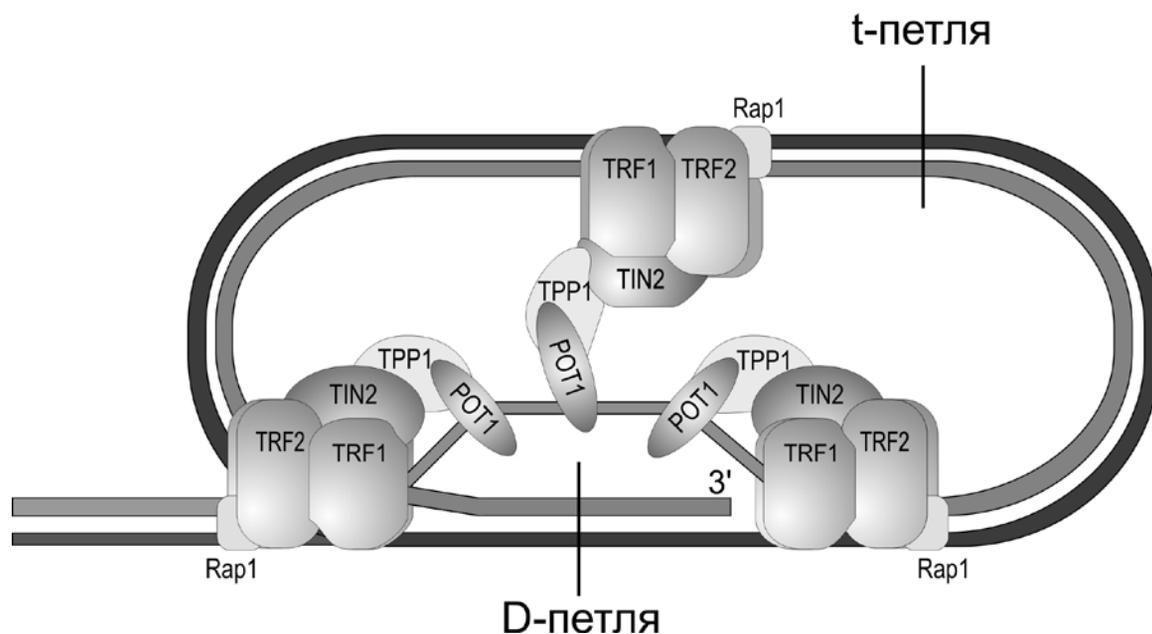


Рис. 1. Схематическое представление структуры конца теломеры и локализация компонентов защитного теломерного комплекса

Ряд белковых факторов, играющих важную роль в репарации ДНК, распознавании разрывов и регуляции клеточного цикла, также ассоциирован с теломерами и играет определенную роль в поддержании их структуры, размеров и нормального функционирования, например, Ku-гетеродимер, комплексы Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) и ATM, а также некоторые другие белковые факторы и комплексы [27]. Показано, что Ku-гетеродимер, связывающийся с двунитевыми разрывами ДНК и необходимый для репарации ДНК путем негомологичной рекомбинации [28], связывается с каталитической субъединицей теломеразы и таким образом может регулировать количество теломеразы на теломерах [29]. И наоборот, TRF2 и его гомолог у дрожжей Taz1 напрямую вовлечены в репарацию ДНК [30, 31]. Таким образом, по мнению некоторых исследователей, граница между нормальным функционированием теломер и рекомбинацией / репарацией теломерной ДНК оказывается размытой [32].

Долгое время считалось, что теломерная ДНК не транскрибируется. Однако в 2007 г Аззалин с соавторами [37] показали, что не только в клетках дрожжей, но и в большинстве тканей млекопитающих с С-обогащенной теломерной нити в направлении от центромеры к теломере с помощью РНК-полимеразы II (RNAPII) считывается длинная некодирующая РНК размером до 9 т.п.н. TERRA содержит как теломерные, так и субтеломерные последовательности. При этом большая ее часть ассоциирована с теломерами путем взаимодействия с белками shelterin комплекса TRF1 и TRF2. В интерфазном ядре TERRA локализована в тех ядерных компартментах, где происходит репликация теломер, а также в тельцах Кахала, ядерных структурах, в которых происходит сборка РНП [34]. Взаимодействие TERRA с белком HP1 (Heterochromatin Protein 1, белок гетерохроматина 1) и триметилированным гистоном H3 K9me3 делает TERRA составной частью теломерного гетерохроматина [35]. TERRA может быть визуализирована в интерфазных ядрах и на концах хромосом с помощью FISH [37]. Будучи естественным лигандом и ингибитором теломеразы, TERRA является регулятором длины теломер [36]. Регулятором ассоциации TERRA с хроматином

являются белки SMG, известные как супрессоры морфогенетических дефектов в гениталиях (Suppressors with Morphogenetic defects in Genitalia). Связывая TERRA, они защищают теломеры от потери ДНК [33]. Структура TERRA, ее биогенез и обмен, а также возможная роль в репликации теломерной ДНК, формировании гетерохроматина и регуляции активности теломеразы подробно рассмотрены в обзорах [37, 38].

Репликация теломер

Двунитевой район теломеры реплицируется с помощью обычной репликативной машины. Как правило, репликация теломер человека начинается из ориджинов, локализованных в субтеломерных районах, и продвигается однонаправлено к концу хромосом, старты репликации внутри теломерных районов наблюдались только в некоторых хромосомах [39].

С-обогащенная нить теломерной ДНК является лидирующей, а G-обогащенная – отстающей в ходе репликации и реплицируется с помощью фрагментов Оказаки. Из-за специфического нуклеотидного состава и структур, образующихся при кэпировании, теломерный хроматин способен образовывать структуры типа шпилек и петель, которые могут затруднять прохождение репликационной вилки. Эта проблема и ее последствия для теломер подробно рассмотрены Джилсоном и Жели [40]. Достаивание однонитевого конца теломеры осуществляется специальным ферментным комплексом теломеразой, который восстанавливает длину теломеры и одновременно стабилизирует кэпированный конец теломеры [41, 42]. В целом такой сложный процесс как репликация теломер зависит от стыковки обычного механизма репликации и достаивания однонитевого конца с помощью теломеразы, систем защиты теломер и репарации разрывов в теломерной ДНК, а также пространственной организации хромосом [40].

Теломераза содержит несколько субъединиц. Субъединица, обладающая активностью обратной транскриптазы (TERT, Telomerase Reverse Transcriptase) [43, 44], в качестве матрицы использует теломеразную РНК (TERC, Telomerase Rna Component) [45], также входящую в состав теломеразы. TERC содержит

район гомологичный 3' району однонитевого G-обогащенного конца. Такое устройство теломеразы позволяет достраивать однонитевой конец теломеры [46, 47] (рис. 2). Третьим компонентом теломеразного комплекса является дискерин (DKC1), модулирующий активность теломеразы, влияя на уровень TERC в клетке [48–50]. Подробно структура теломеразы, ее роль в удлинении теломер и подходы к регуляции активности рассмотрены в обзоре Зверевой с соавторами [51].

Участие теломеразы в репликации теломер проходит только при контакте теломеразы с теломерами. Процесс привлечения теломеразы к теломерам изучен недостаточно. Установлено, что в клетках человека ключевую роль в этом процессе играют тельца Кахала и один из компонентов shelterin комплекса TPP1, связанный с теломерой через TIN2 [52, 53]. Таким образом, компоненты shelterin комплекса напрямую определяют взаимодействие теломеразы с теломерой. Как мы уже указывали, тельца Кахала играют также важную роль в биогенезе TERRA, являющейся одним из ингибиторов теломеразы [34, 36].

Показано, что в отдельные периоды S фазы теломераза ассоциирована только с несколькими теломерами [54]. Это может свидетельствовать о том, что теломеры реплицируются асинхронно. Действительно, индивидуальные теломеры в клетках индийского карликого оленя и человека реплицируются асинхронно в течение всего S периода [55, 56].

Долгое время считалось, что достраивание C-обогащенной теломерной нити после достраивания однонитевого конца теломеразой происходит координировано с удлинением G-обогащенной нити по принципу комплементарности с помощью обычного механизма репликации. Однако недавно было показано, что, по крайней мере в опухолевых клетках, достраивание C-обогащенной нити является также теломеразо-зависимым процессом и происходит в поздней S фазе или начале G2 периода независимо от того, когда в S фазе реплицировалась G-обогащенная нить [57]. Авторы исследования предложили модель, согласно которой репликация теломер связана с циклическими модификациями теломер, расплетанием ДНК и кэпированием теломеры.

Роль теломеразы и теломер в репликативном старении и онкотрансформации

Высокая активность теломеразы характерна для плюрипотентных эмбриональных стволовых клеток и клеток на ранних стадиях эмбрионального развития. Почти во всех соматических клетках с возрастом человека активность теломеразы постепенно уменьшается и параллельно этому в результате концевой недорепликации наблюдается дисфункция теломер: укорочение теломер до критического размера и увеличение числа некэпированных теломер [58, 59]. В большинстве соматических клеток взрослых индивидуумов активная теломераза практически не выявляется. Такие клетки не делятся и вступают в так называемое репликативное старение [58–60]. В клетках лиц преклонного возраста теломеры могут содержать от 0,9 т.п.н в фибробластах кожи до 11 т.п.н теломерного повтора в клетках крови [61]. Использование Q-FISH показало, что размер теломер в стареющих культивируемых фибробластах человека составляет 0,4–1,8 т.п.н; при каждом делении теломеры теряют 25–51 н.п. Причем укорочение теломер до критического размера предшествует наступлению репликативного старения [62]. Следствием дисфункции теломер при репликативном старении является активация сигнального пути репарации разрывов ДНК и следующая за этим негомологичная рекомбинация, приводящая к слиянию хромосом теломерными районами [58].

Идентификация shelterin комплекса теломер и выяснение роли отдельных компонентов комплекса в сохранении целостности хромосом привели к предположению, что не только укорочение теломер как таковое может приводить к репликативному старению, но и изменение статуса shelterin комплекса, и активация в связи с этим сигнальных путей репарации ДНК. Показано, что в стареющих фибробластах человека репликативное старение не наблюдается, если концентрация TRF2 достаточна, чтобы предотвратить концевые слияния хромосом, содержащих теломеры, укороченные до критического размера [63].

В дисфункциональных теломерах, чрезмерно укороченных или некэпированных из-за дефицита или дисбаланса компонентов shelter-

in, формируется ATM (Ataxia Telangesia Mutated) комплекс, необходимый для негомологичной рекомбинации или ATR (Ataxia Telangesia и Rad3 related) зависимый ответ, выражающийся в гомологичной рекомбинации на концах хромосом. Наличие на концах хромосом рекомбинационного комплекса (DDR, DNA Damage Response) приводит к аккумуляции в этих районах γ -H2AX гистона (гистона H2AX фосфорилированного по серину 139), являющегося одним из вариантов корового гистона H2A, и свидетельствует об изменении структуры теломерного хроматина в районах нерепарированных двунитевых разрывов ДНК [64–66]. Иммуногистохимическая реакция с антителами к фосфорилированному короткому пептиду, соответствующему С концу H2AX, является чувствительным маркером для выявления дисфункциональных теломер. Недавно было показано, что спонтанная частота DDR+ теломер в нормальных диплоидных клетках человека составляет в среднем 5 DDR+ теломер / метафазу. Перед репликативным старением и в период репликативного старения число DDR+ теломер может увеличиваться до 15 [67–68].

В региональных стволовых клетках человека процесс репликативного старения выражен существенно слабее, чем в соматических [62, 69–71]. Таким образом, у человека сохранность структуры и размера теломер не только предохраняет концы хромосом от эрозии, но и напрямую отражает митотический возраст клетки и ее способность к делению, что предполагает наличие связи между активностью теломеразы, размером теломер, возрастом индивидуума и делением клеток. Репрессия теломеразы в стареющих клетках связана с репрессией каталитической субъединицы. Внедрение в геном стареющих клеток активного гена *TERT*, как правило, приводит к восстановлению теломеразной активности и увеличению длины теломер [72, 73]. Однако до сих пор не ясно, какие процессы способствуют репрессии гена *TERT* при репликативном старении клеток.

Важная роль теломер и теломеразы в клеточном делении была продемонстрирована также при изучении свойств iPS клеток (Induced Pluripotent Stem cells, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки). Было

показано, что в линиях iPS клеток теломеры существенно длиннее, чем в донорских, а активность теломеразы выше. Причем частота получения iPS клеток резко падала при использовании в качестве донорских клетки теломеразо-дефицитных мышей (TERT/TERT-) 3-го поколения с укороченными теломерами [74–77], т.е. для репрограммирования соматических клеток в плюрипотентные необходимо, по-видимому, определенная длина теломер. Любопытный факт, длина теломер как в iPS клетках, так и в ES клетках (Embryonic Stem cells, эмбриональные стволовые клетки) мышей увеличивалась по мере их культивирования [77]. Скорее всего, наличие в них сверхдлинных теломер отражает изменение свойств гетерохроматинового теломерного домена при культивировании плюрипотентных клеток *in vitro*, в частности, изменение концентрации одного из белков shelterin комплекса TRF1 [78].

Несколько по-иному, чем у человека, проходит репликативное старение в клетках лабораторных мышей. Мыши без активной теломеразы (TERC-/TERC-) могли размножаться в течение шести поколений, а фибробласты, изолированные из таких животных, могли быть введены в культуру. Однако в ряду поколений мышей без активной теломеразы наблюдалось постепенное укорочение теломер вплоть до их исчезновения. Данные свидетельствуют о том, что у мышей активная теломераза необходима для поддержания длины теломер, но деление клеток у этих животных длительное время может проходить без участия теломеразы. Возможно, что этот феномен связан с наличием у лабораторных мышей сверхдлинных теломер [79–80].

Большинство исследователей наличие в клетках человека репликативного старения рассматривает как барьер для злокачественного перерождения клеток [81]. Эти представления перекликаются с правилом Хейфлика, свидетельствующим о том, что в культуре фибробласты человека могут делиться ограниченное число раз, не более 60, причем число возможных делений зависит от возраста донора [82, 83]. Преодоление репликативного старения в бессмертных клеточных линиях человека, в том числе опухолевых, в основном, сопряжено с активацией теломеразы и увеличением дли-

ны теломер. Связь между озлокачествлением, длиной теломер и активностью теломеразы рассматривалась неоднократно. Здесь мы коротко приведем наиболее распространенный взгляд на этот процесс с точки зрения биологии теломер [83–85]. Предполагается, что прежде чем стать злокачественной, нормальная клетка человека проходит, как минимум, 2 критических периода. Первый, или клеточное/репликативное старение (M1), характеризуется резким понижением активности теломеразы и укорочением до критического размера нескольких теломер, которые и участвуют в слиянии хромосом концами. При этом клетки остаются живыми, в них продолжают обменные процессы. Большинство соматических клеток человека находятся в этом периоде достаточно долго. В редких случаях, частота которых оценивается как 10^{-7} , в стареющих клетках дополнительно теряется контроль над клеточным делением (например, в отсутствии активации p53 и / или r16|Rb), и клетки начинают делиться. Часть из них может вступить во вторую стадию кризиса клеточного роста (M2), когда все или почти все теломеры укорачиваются до критического размера, а активная теломераза не выявляется. В это время клетки балансируют на грани гибели. Из такого состояния есть 2 выхода: или апоптоз, или сопряженное с реактивацией теломеразы бессмертие, т.е. озлокачествление. При этом клетки с низкой активностью теломеразы не способны долго делиться и, по-видимому, не образуют опухолей. Если же активность теломеразы достаточно высока, то теломеры быстро увеличиваются до размера большего, чем это необходимо для предотвращения слияния хромосом концами при активации системы репарации двунитевых разрывов ДНК. Такие клетки могут дать начало злокачественным опухолям. Однако на практике таких первичных опухолей менее 10%, и они не имеют селективного преимущества. Большинство злокачественных опухолей имеют стабильные не слишком длинные теломеры и активность теломеразы как в нормальных диплоидных клетках или несколько ниже. Преодоление M2 кризиса является важным этапом в опухолевой прогрессии.

Для объяснения динамического взаимодействия между длиной теломер и активностью теломеразы в бессмертных клетках человека была предложена концентрационная модель,

которая объясняет, как в условиях кризиса клетка выбирает свою судьбу. Согласно этой модели, существует механизм в *cis* положении, учитывающий какое количество каждого из shelterin факторов должно быть связано с индивидуальной хромосомой. Предполагается, что если хромосома длиннее, чем полагается, то она связывает больше факторов, чем теломера нормальной длины [86, 87]. В результате изменяется доступность теломеры для теломеразы, и она укорачивается. Таким образом, длина теломер в случае преодоления барьеров M1 и M2 в значительной степени определяется как результат обратной зависимости активности теломеразы от концентрации белков shelterin на теломерах. Следует также иметь в виду, что некоторые субъединицы shelterin (TIN2, TRF1, and TPP1) могут влиять на длину теломер независимо от теломеразы [78, 88].

В настоящее время активность теломеразы и размер теломер в опухолевых клетках рассматривается как прогностический признак при оценке опухолевой прогрессии [83, 88], а подавление активности теломеразы – как одно из возможных направлений в комплексном лечении теломеразо-зависимых опухолей. Сейчас намечаются некоторые успехи в этом направлении [89].

Механизм укорочения сверхдлинных теломер в нормальных диплоидных клетках

Наряду с хорошо известным механизмом укорочения теломер, связанным с концевой недорепликацией, недавно был описан механизм быстрого укорочения теломер или вырезание теломерных повторов на конце сверхдлинных теломер (telomere trimming) в опухолевых клетках [91]. Ранее это явление было известно как быстрая делеция теломер (TRD, Telomere Rapid Deletion) у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [92] и механизм, регулирующий длину теломер у *Arabidopsis thaliana* [93]. В опухолевых клетках человека, содержащих сверхдлинные теломеры, наблюдали t-кольцевую нехромосомную теломерную ДНК. Согласно предложенной авторами модели, чрезмерное удлинение теломер приводит к удалению t-петли в результате внутривнутрихромосомной гомологичной рекомбинации при сползании структуры типа перекреста Холли-

дея в район формирования петли. У человека этот механизм опосредуется продуктом гена *xrcc3* (Rad51 подобным белком репарации ДНК) и генерирует t-кольцевую ДНК, а в качестве промежуточной хромосомную укороченную теломерную ДНК с одноцепочечным 5' С-обогащенным концом (рис. 3). Обычно такого рода процесс не инициирует DDR и не приводит к слиянию хромосом. Недавно было показано, что быстрая потеря теломерной ДНК происходит также в нормальных клетках человека (клетках зародышевого пути у мужчин и лейкоцитах, стимулированных к делению обработкой фитогемаагглютинином), а также в клетках тканей мышей [94]. Таким образом, длина теломер в нормальных и опухолевых клетках определяется балансом между удлинением и укорочением теломер. При этом

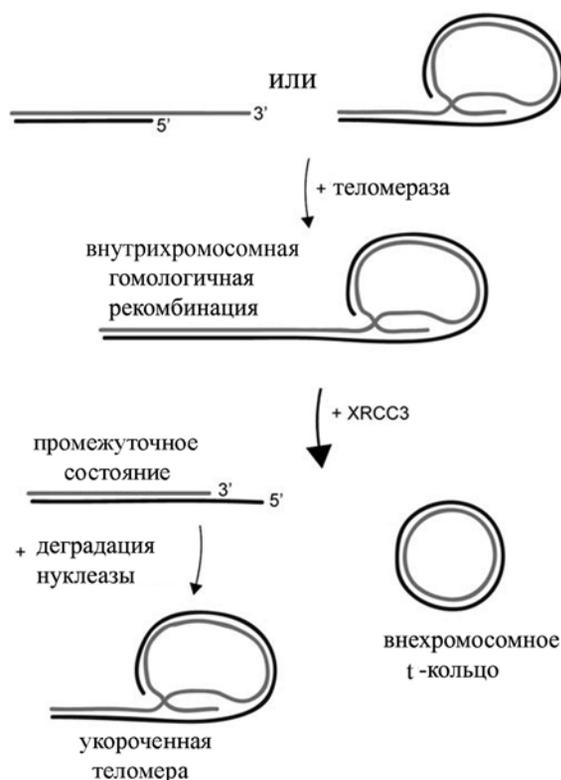


Рис. 3. Предлагаемая модель быстрого укорочения теломер в клетках млекопитающих путем вырезания t-петли. Удлинение теломеры до определенной критической длины запускает внутри хромосомную гомологичную рекомбинацию. Механизм опосредуется белком гомологичной рекомбинации XRCC3 с образованием промежуточного продукта теломерной ДНК с однонитевым 5' С-обогащенным концом. В результате образуется укороченная теломера и экстрахромосомное t-кольцо

важную роль в контроле над длиной теломер играет не только активность теломеразы и статус shelterin комплекса, но и наличие внутрихромосомной гомологичной рекомбинации по типу TRD.

Альтернативный механизм контроля длины теломер

Определение активности теломеразы в бессмертных клеточных линиях и в первичных опухолях человека показало, что не во всех них имеется активная теломераза. Впервые этот факт и его связь с определенными характеристиками теломер были описаны Брайаном с соавторами [95]. Изученные авторами 15 клеточных линий человека без активной теломеразы имели длинные, содержащие более 50 т.п.н. теломерного повтора, теломеры гетерогенного размера. В дальнейшем оказалось, что опухоли, не содержащие активную теломеразу, – нередкое явление. В 25–60% случаев астроцитом и сарком и в 5–15% карцином, а также в ряде других опухолей увеличение длины теломер происходит не в результате восстановления активности теломеразы, а альтернативным путем, получившим название ALT (Alternative Telomere Lengthening, альтернативное удлинение теломер). Чаще всего ALT наблюдается в опухолях человека мезенхимального происхождения; причина такого предпочтения не ясна [96]. Отличать опухоли, в которых наблюдается ALT, от теломеразозависимых опухолей чрезвычайно важно, поскольку способ поддержания длины теломер непосредственно влияет на прогноз опухолевой прогрессии, а в будущем, возможно, и на подходы к лечению онкологических заболеваний. Как правило опухоли, состоящие из ALT-клеток имеют худший прогноз, чем теломеразозависимые опухоли [97].

Характеристики ALT клеток человека суммированы в обзоре Хенсон и Реддель [96]. Ниже мы попробуем провести критический анализ главных из них.

1. Золотым стандартом ALT до сих пор считается наличие в клетках теломер при длительном отсутствии в них активной теломеразы.

2. Гетерогенность размера теломер в одной и той же клетке и флуктуация размера теломер в ходе культивирования клеток от очень длинных, содержащих более 100 т.п.н. теломерного

повтора, до очень коротких, не выявляющихся FISH с PNA теломерной пробой [98]. Часто в ALT клетках наблюдается также «функциональное» укорочение теломер, связанное с наличием в теломерах частично деградированных теломерных последовательностей [99]). Следует заметить, что гетерогенность размеров теломер характерна также для клеток, в которых длина теломер контролируется механизмом быстрого укорочения теломер (telomere trimming) [91, 94].

3. Наличие в ALT клетках APBs телец (ALT-associated PML Bodies (ProMyelocytic Leukemia nuclear bodies, промиелоцитические лейкоэмические ядерные тельца)). APBs тельца представляют собой характерную для ALT клеток разновидность PML телец. APBs от PML телец отличает то, что они содержат компоненты shelterin комплекса, кольцевую и линейную теломерную ДНК, а также факторы репарации и рекомбинации ДНК. Недавно было показано, что с одним APB может контактировать сразу несколько теломер, соединенных между собой тонкими мостиками теломерной ДНК. По-видимому, этот факт играет важную роль в рекомбинации между теломерами гомологичных и гетерологичных хромосом [100]. Следствием такой рекомбинации может быть неравный обмен теломерной ДНК между хромосомами, вносящий определенный вклад в гетерогенность размера теломер в ALT клетках. Возможно, из-за небольшого размера, APBs выявляются не во всех ALT клеточных линиях. С другой стороны, они описаны в некоторых теломеразо-зависимых линиях, содержащих сверхдлинные теломеры и экспрессированный механизм быстрого укорочения длины теломер [94].

4. Повышенный уровень гомологичной рекомбинации теломерной ДНК в ALT клетках выражается как в наличии повышенного уровня пострепликативных теломерных сестринских хроматидных обменов (T-SCE), не связанных с общим повышением частоты сестринских хроматидных обменов в других районах хромосом [101, 102], так и в повышенном уровне t-кольцевой теломерной ДНК и теломерной ДНК с односторонним 5' С-обогащенным концом. Обычно в опухолевых ALT клетках повышенный уровень гомологичной рекомбинации теломерной ДНК,

в том числе С-обогащенной кольцевой ДНК, коррелирует с наличием в них APBs. Но в небольшом проценте опухолей, в которых наряду с признаками ALT наблюдается активная теломераза, С-кольцевая ДНК не выявляется [103]. Авторы исследования полагают, что теломераза разрушает связь между APBs и продукцией С-кольцевой ДНК. Чтобы проверить это предположение, они интегрировали в ALT клетки ген теломеразы и впоследствии наблюдали значительное уменьшение уровня С-кольцевой ДНК, а вместо теломерной ДНК с односторонним С-обогащенным концом появление ДНК с односторонним G-обогащенным концом.

Таким образом, анализ признаков ALT привел авторов обзора к выводу, что практически единственной чертой, характерной только для ALT клеток, является отсутствие в них активной теломеразы [96].

Механизм ALT до конца не ясен. Большинство исследователей склоняется к тому, что в бессмертных клетках человека в ALT вовлечены гомологичная рекомбинация, а также репликация экстрахромосомной теломерной ДНК с помощью механизма катящегося кольца с последующей интеграцией нехромосомной ДНК в теломеры [104–108]. Однако неясно, как клетка выбирает, какой механизм ей использовать для преодоления клеточного старения, реактивировать теломеразу или механизм гомологичной рекомбинации. Возможно, что причина активации именно рекомбинационных процессов связана с возникающей в ALT клетках диспропорцией между количеством теломерной ДНК и белками shelterin комплекса. Как мы упоминали выше, важную роль в репрессии гомологичной рекомбинации играют RAP1 и TPP1/POT1. Нарушение их взаимодействия с теломерной ДНК может приводить к активации гомологичной рекомбинации и, как следствие, к ALT. Как мы видели выше, схожие процессы могут происходить и в клетках с активной теломеразой.

Первоначально доказательства того, что рекомбинация ДНК участвует в восстановлении теломер в случаях, когда активная теломераза отсутствует, были получены на дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*. Выживающие без активной теломеразы колонии были двух типов: медленно и быстро растущие. Для их появления был необходим RAD52 [109]. Восстановление длины теломер в медленно растущих колони-

ях проходило по типу I, характеризующемуся, главным образом, амплификацией Y' субтеломерных элементов, представляющих собой несколько субтеломерных повторов размером 6,7 т.п.н. Y' элементы оказывались разделенными короткими вставками теломерных повторов размером от 50 до 150 п.н. Сами теломеры при этом были небольшого размера. Для выживания таких колоний, кроме RAD52, была необходима активность факторов Rad51, Rad54, Rad55 и Rad57 [110]. Удлинение теломер в быстро растущих колониях (тип II) происходило с помощью амплификации только теломерных повторов. В этом случае для выживания колоний была необходима также активность комплекса MRX (Mre11-Rad50-Nbs1) [111–112]. Действительно, показано, что Rad50 и Nbs1 играют важную роль в выживании ALT клеток человека [112]. Эти и другие факты [113–116] свидетельствуют о том, что механизм восстановления длины теломер в ALT клетках человека похож на механизм восстановления теломер в колониях типа II *Saccharomyces cerevisiae* и достаточно хорошо описывается гомологичной рекомбинацией, тогда как выживание колоний типа I *Saccharomyces cerevisiae* зависит от негомологичной рекомбинации.

До последнего времени возможность того, что ALT клетки млекопитающих могут использовать нескольких различных путей для восстановления теломер, не рассматривалась. Однако некоторые различия, обнаруженные Морриш и Грейдер [117] между ALT клетками человека и мыши, трактуются ими в пользу того, что в некоторых случаях в ALT клетках может быть активирован механизм негомологичной рекомбинации теломерной ДНК. По их мнению, один тип удлинения теломер, похожий на тип II в дрожжах и основанный, в основном, на гомологичной рекомбинации, доминирует в ALT опухолевых клетках человека, а другой, похожий на тип I в дрожжах и основанный на негомологичной рекомбинации – в опухолях мышей и в нормальных клетках человека. В последнем случае авторы наблюдали не увеличение размера теломер, а некоторое их укорочение, сопровождающееся флуктуацией размеров. Они пришли к выводу, что в ALT клетках процессы негомологичной рекомбинации запускает не отсутствие теломеразы как таковой, а именно укорочение теломер и, возможно, нарушение их кэппинга.

Однако не исключено, что укорочению, флуктуации размера и нарушению кэппинга теломеры обязаны не негомологичной рекомбинации, а механизму быстрого укорочения теломер.

Поскольку в соматических гибридах человека между теломеразо-зависимыми и ALT клетками наблюдалась репрессия ALT, то предполагалось, что теломеразо-зависимый путь восстановления длины теломер является доминантным по отношению к ALT и, по-видимому, в клетках существуют факторы, подавляющие ALT [118]. Недавно было показано, что мутации и потеря генов *ATRX/DAXX* хроматин-ремоделлирующего комплекса коррелирует с ALT-зависимым удлинением теломер в ряде опухолей и в панели из 22-х ALT линий [119, 120]. Тем не менее, известны бессмертные клеточные линии человека, в которых при сохранении теломеразной активности наблюдались также признаки ALT [121, 122]. Характерно также, что в раннем эмбриональном развитии мыши есть периоды, когда ALT не только соседствует, но даже преобладает над теломеразо-зависимым удлинением теломер [123].

Приведенные данные позволяют считать, что в не только в опухолевых и трансформированных, но и в нормальных диплоидных клетках млекопитающих, очевидно, могут одновременно функционировать теломеразо-зависимый и рекомбинационный пути контроля над длиной теломер, которые и будут определять динамику длины теломер. При этом в разных по физиологии клетках, а, возможно, и у разных видов животных удельный вес рекомбинационного пути может быть различным. В нормальных клетках человека он, по-видимому, невелик и ограничен механизмом быстрого укорочения длины теломер, тогда как в теломеразо-зависимых первичных фибробластах одного из видов бурозубок, бурозубки иберийской, он весьма значителен [124]. Возможно, что в отсутствие теломеразы контроль над длиной теломер во многом осуществляется shelterin комплексом, важной функцией которого является регуляция гомологичной и негомологичной рекомбинации теломерной ДНК. Вопрос о том, что же такое ALT и существуют ли принципиальные различия между ALT и одним из способов контроля над длиной теломер в нормальных клетках, на сегодняшний день представляется открытым.

Влияние теломер на архитектуру интерфазных ядер

Уже в первых работах по изучению 3D локализации теломер было показано, что в ядрах лимфоцитов мышей значительное число теломерных кластеров локализовано на периферии клеточного ядра, тогда как в лимфоцитах человека большинство теломерных кластеров находится во внутреннем пространстве ядер [125, 126]. Поскольку центромеры, как правило, локализованы на периферии ядер, то периферийная локализация части теломер у мышей может отражать тот факт, что хромосомы мыши являются телоцентрическими [13]. Ранее было показано, что в интерфазных ядрах млекопитающих комплекс теломерная ДНК – TRF представляет собой отдельные конденсированные структуры, связанные с ядерным матриксом [127]. Причем по данным авторов, белки shelterin комплекса TRF входят в состав ядерного матрикса. Поскольку весьма вероятно, что с ядерным матриксом связан также репликативный комплекс [128], то возможна связь между характером репликации теломер и их положением в ядре. Данные такого рода были получены Арно с соавторами [56]. Они выявили зависимость между временем репликации теломер в хромосомах человека и их позицией в ядре. Поздно реплицирующиеся теломеры были предпочтительно локализованы на периферии ядер, в то время как рано реплицирующиеся – в других компартментах ядра. Авторы считают, что именно субтеломерные последовательности, в которых расположены ориджины репликации теломерной ДНК, могут влиять как на характер репликации теломер, так и на их положение в ядре. Недавно было показано, что теломеры шимпанзе, к которым прилегают гетерохроматизированные субтеломеры, реплицируются позже, чем теломеры без таких субтеломер. Однако, у горилл, у которых большинство субтеломер гетерохроматизированы, такой закономерности выявлено не было [129]. О том, что часть теломер человека может быть локализована на периферии ядер свидетельствуют также данные Раз с соавторами [130], которые обнаружили связь между ядерной ламиной и теломерами. Данные о факторах, влияющих на локализацию теломер в ядрах клеток млекопитающих, весьма ограничены.

Периферийная локализация теломер в клетках *Saccharomyces cerevisiae* позволяет использовать их как модель для изучения механизмов, контролирующих положение теломер. Оказалось, что в G1 стадии клеточного цикла теломеры заякорены на ядерной оболочке с помощью комплекса Sir4p (Silent information regulatory, регулятор подавления транскрипции) – Ku80 путем взаимодействия Sir4 с Rap1; во время репликации наблюдается перемещение теломер с периферии во внутреннее пространство ядра. Изменение позиции теломер происходит в результате репрессии во время репликации фактора Ku80 [131]. Таким образом, позиция теломер в ядрах, как дрожжей, так и млекопитающих, по-видимому, напрямую связана с их репликацией.

Считается, что в нормальных диплоидных клетках млекопитающих, в том числе человека, теломеры, как правило, не формируют агрегатов. Образование теломерных агрегатов, приводящее к неслучайному положению теломер / хромосом в ядре, описано для клеток, вступающих в репликативное старение и для ALT клеток [100, 131]. Образованию теломерных агрегатов в ALT клетках, по-видимому, способствует наличие в них APBs, с каждым из которых контактирует сразу несколько концов хромосом [100]. Ассоциации теломер, по-видимому, возможны и в нормальных клетках. Теломерные агрегаты и связь их с APBs были описаны при изучении пространственной организации ядер первичных фибробластов иберийской бурозубки [132]. Следует заметить, что при переходе этих клеток из статуса первичных в длительно перевиваемые в них не наблюдалось признаков кризиса клеточного роста / репликативного старения.

Давно известен факт формирования хромосомного букета в профазе I мейоза животных и растений, когда хромосомы теломерами прикрепляются к ядерной оболочке. Считается, что образование теломерного кластера облегчает гомологичное спаривание хромосом и рекомбинацию между ними. У дрожжей образования «букета» не происходит, когда отсутствует компонент shelterin комплекса Rap1. Однако у млекопитающих формирование хромосомного букета не зависит от наличия или отсутствия ортолога Rap1 [133]. Возможно, что у млекопитающих другие компоненты shelterin взяли на себя эту функцию.

Таким образом, в клетках, делящихся как путем мейоза, так и митоза, теломеры играют несомненную роль в организации архитектуры клеточного ядра.

Биология теломер у разных видов млекопитающих

Размер теломер у плацентарных млекопитающих в основном колеблется от 10 до 50 т.п.н. Исключение составляют лабораторные линии мышей, чьи длинные гипервариабельные теломеры могут содержать от 30 до 150 т.п.н. теломерного повтора [134, 135], в то время как теломеры диких мышей не такие длинные, как лабораторных линий. Длина теломер у диких мышей *Mus musculus* и *Mus spretus* варьирует от 5 до 25 т.п.н. [136]. Длинные теломеры описаны также у одного из видов бурозубок, бурозубки иберийской, чьи теломеры на проксимальных концах 32 акроцентриков содержат до 300 т.п.н. теломерного повтора (в среднем – 213). При этом на остальных концах хромосом этого вида локализованы короткие теломеры, средний размер которых составляет 3,8 т.п.н. [136, 137]. Однако у вида-близнеца, бурозубки обыкновенной, теломеры по размеру схожи с теломерами человека [138].

Полагают, что определенную роль в формировании теломер играют генетические факторы. Резкое увеличение длины теломер у мышей лабораторных линий связывают с инбридингом. Наиболее длинные теломеры описаны в линиях, подвергавшихся наиболее длительному инбридингу [139]. Предполагаемым кандидатом, определяющим разницу в длине теломер у *Mus musculus* и *Mus spretus*, является геликаза RTEL1, чей ген локализован на хромосоме 2 [140]. Показано, что RTEL1 играет важную роль в стабильности генома мыши. Он участвует в репарации двунитевых разрывов ДНК и является регулятором митотической и мейотической рекомбинации. В дефицитных клетках наблюдается неконтролируемая гомологичная рекомбинация. Как регулятор гомологичной рекомбинации он может быть одним из участников выбора ALT пути в клетках мыши. У человека лишь недавно была выявлена роль RTEL1 в физиологии теломер. Было установлено, что мутации в гене *RTEL1* могут быть причиной синдрома Nooyeraal-Hreidarsson, сопровождающегося

множественными нарушениями, в том числе укорочением теломер. Установлено, что у человека RTEL1 взаимодействует с теломеразой и компонентом shelterin TRF1, что указывает на потенциальную роль RTEL1 в регуляции длины теломер человека [141].

Установлено, что средняя длина теломер человека значительно варьирует и является количественным мультигенным признаком. По разным оценкам, наследственная составляющая этого показателя составляет от 35 до 80% [142, 143]. Локусы, влияющие на длину теломер человека, были картированы на хромосоме 12 (предположительно это ДНК геликаза *ddx11* [144]), хромосоме 14 и, возможно, хромосомах 10 и 3 [145]. Выявлено также отрицательное влияние на длину теломер SNP в интроне 1 гена *bicd1* (Bicaudal-D homolog 1) [146]. Кроме того, была выявлена связь между длиной теломер и локусом *obfc1* (oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold containing 1) [147].

За исключением *obfc1*, остальные факторы, очевидно, не имеют прямого отношения к регуляции длины теломер. *Obfc1* может связываться с одонитевой теломерной ДНК и, таким образом, участвовать в регуляции функционирования теломер. Повышенная экспрессия мутантного гена *obfc1* приводит к увеличению длины теломер [148].

Непосредственно на длину теломер в клетках человека влияет активность теломеразы. В связи с этим был предпринят ряд попыток выявить связь между мутациями в генах *TERT* и *TERC* с одной стороны, и длиной теломер у человека, с другой стороны. Известно, что ряд мутаций в генах *TERT* и *TERC* связаны с рядом наследственных синдромов и злокачественных заболеваний. Такие пациенты характеризуются укорочением теломер, и, по-видимому, ранней потерей стволовых гематопозитических клеток [149]. Данные о генетическом контроле активности теломеразы и длиной теломер у здоровых лиц достаточно противоречивы. Недавно было показано, что хромосомы здоровых долгожителей из популяции евреев Ашкенази и их потомков характеризуются более длинными, по сравнению с контрольной группой лиц, теломерами и повышенной экспрессией как *TERT*, так и *TERC*. Был выявлен также гаплотип *TERT*, непосредственно связанный

с наличием длинных теломер у долгожителей [150]. Авторы предполагают, что положительно влияющие на длину теломер мутации гена теломеразы также могут оказывать эффект на здоровье человека и продолжительность его жизни в целом. Однако широкомасштабные геномные исследования, в которых пытались выявить связь между SNP в локусе *TERC* и длиной теломер у человека не дали таких однозначных результатов. В исследовании Леви с соавторами [148] связь между *TERC* и длиной теломер была подтверждена, тогда как в исследовании Прескотт с соавторами [36] достоверная связь между ними не была выявлена. Таким образом, несмотря на несомненное влияние генетических факторов на длину теломер человека, то, каким образом это влияние осуществляется, до сих пор не установлено, не выявлены главные гены, определяющие длину теломер.

В настоящее время представляется, что репрессия теломеразы в соматических тканях млекопитающих не является универсальным явлением. Так, в большинстве соматических тканей мышей, а также в культивируемых *in vitro* при физиологических концентрациях углекислого газа фибробластах мышей не наблюдается репликативное старение и подавление активности теломеразы [151]. Наиболее обширное исследование по биологии теломер млекопитающих было проведено Гомес с соавторами [152]. У 60 видов млекопитающих из разных отрядов было проведено сравнение 4-х параметров: длины теломер, активности теломеразы, продолжительности жизни и веса животных. Несмотря на то, что между продолжительностью жизни изученных видов и размером животных существует взаимосвязь, между длиной теломер и продолжительностью жизни наблюдалась обратная зависимость, а между активностью теломеразы и массой тела – прямая связь. Используя эволюционный подход, авторами была проведена реконструкция предполагаемого предкового варианта теломер плацентарных млекопитающих. Авторы полагают, что теломеры гипотетического предка имели длину менее 20 т.п.н., и репрессируемую теломеразу как в соматических клетках человека. Для видов с теломерами длиной более 20 т.п.н. репликативное старение, очевидно, не характерно. По-видимому,

репликативное старение возникло в результате адаптации к теплокровному образу жизни как компенсация увеличивающегося при этом пула мутаций. Эволюционный подход к биологии теломер позволил сделать вывод о том, что вклад репликативного старения в опухолевую супрессию несомненен, но это лишь один из многих факторов, определяющих продолжительность жизни разных видов млекопитающих. По мнению авторов, тот факт, что механизмы защиты от окислительного стресса снижены у видов с длинными теломерами, предполагает преимущество потери репликативного старения для видов с длинными теломерами и сохранение его у видов с короткими теломерами.

Любопытным является факт обнаружения у неплацентарных млекопитающих прерывистых теломер, когда фрагменты теломерной ДНК в несколько т.п.н. длиной перемежались фрагментами ДНК, содержащими сайты рестрикции к нетеломерной ДНК [152]. Схожие по строению теломеры были описаны нами у одного из видов бурозубок, бурозубки иберийской. Прерывистые длинные теломеры бурозубки иберийской локализованы на проксимальных концах акроцентриков и содержат вставки рибосомальной ДНК. Как говорилось выше, бурозубки иберийская и обыкновенная являются видами-близнецами. Их кариотипы составлены практически из одинаковых хромосомных плеч [137, 138]. Но если у бурозубки иберийской ядрышковые организаторы локализованы на проксимальных концах всех акроцентрических хромосом, то у бурозубки обыкновенной – в терминальных районах четырех плеч и прилегают к теломерам [136]. Считается, что предшественником бурозубки иберийской была хромосомная раса *Cordon* бурозубки обыкновенной, от которой она отличается распадом нескольких двуплечих хромосом. Можно предположить, что прерывистые теломеры бурозубки иберийской образовались из теломер, схожих по длине с теломерами бурозубки обыкновенной или человека в результате глобальной реорганизации терминальных районов хромосом, спровоцированной необходимостью формирования новых теломер. Возможно, что на стадии хромосомного букета в мейозе

между концами хромосом произошла межхромосомная рекомбинация, затронувшая теломерные и прилегающие к ним рибосомальные последовательности, следствием чего явилось копирование их в гомологичные и гетерологичные концы хромосом. Похожий механизм может быть в основе образования прерывистых теломер и у не плацентарных млекопитающих.

Теломеры являются хромосомными структурами, необходимыми для нормального функционирования хромосом. За небольшими вариациями нуклеопротеиновый теломерный комплекс у млекопитающих универсален. Важным показателем функционального статуса теломер является их длина и кэпирование / отсутствие кэпинга на концах теломеры. Теломеры представляют собой динамичные структуры, длина которых определяется взаимодействием многих факторов, активностью теломеразы, статусом защитного теломерного комплекса и ассоциированных с теломерами факторов репликации, рекомбинации и репарации разрывов ДНК и т.д. Слаженная работа этой сложной многокомпонентной системы обеспечивает стабильность генома, предупреждает апоптоз и онкотрансформацию клеток, участвует в пространственной организации клеточного ядра. К важным достижениям последних лет можно отнести открытие механизма быстрого укорочения длины теломер в нормальных диплоидных клетках, который так же, как механизм ALT основан на гомологичной рекомбинации теломерной ДНК, а также повышенную рекомбинационную активность в нормальных клетках некоторых видов млекопитающих. Эти факты подводят общий знаменатель под два кажущихся разными пути определения длины теломер, теломеразо-зависимый и альтернативный. Тем не менее, изучение теломер показало, что биология теломер, в частности, их размер и способ поддержания длины и структуры, может отличаться даже у представителей одного отряда млекопитающих. Подробное изучение биологии теломер у видов не традиционных для этой области исследований позволит лучше понять принципы организации теломер и их функционирования.

Работа поддержана частично бюджетным проектом Института цитологии и генетики СО РАН VI.45.1.6. «Молекулярная и функциональная организация и эволюция эукариотических хромосом» и грантом РФФИ № 13-04-00157.

Список использованных источников

1. The relationship between spontaneous telomere loss and chromosome instability in a human tumor cell line / B. Fouladi [et al.] // *Neoplasia*. – 2000. – Vol. 2. – P. 540–554.
2. Bailey, S.M. Telomeres, chromosome instability and cancer. *Nucleic Acids Res.* / S.M. Bailey, J.P. Murnane // *Acids Res.* – 2006. – Vol. 34. – P. 2408–2417.
3. The loss of a single telomere can result in instability of multiple chromosomes in a human tumor cell line / L. Sabatier [et al.] // *Mol. Cancer Res.* – 2005. – Vol. 3. – P. 139–150.
4. Оловников, А.М. Принцип маргинотомии в матричном синтезе полинуклеотидов / А.М. Оловников // *Доклады академии наук СССР*. – 1971. – Т. 201. – С. 1496–1499.
5. Olovnikov, A.M. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon / A.M. Olovnikov // *J. Theor. Biol.* – 1973. – Vol. 41. – P. 181–190.
6. Chan, S.W. Telomerase and ATM/Tel1p protect telomeres from non-homologous end joining / S.W. Chan, E.H. Blackburn // *Mol. Cell.* – 2003. – Vol. 11. – P. 1379–1387.
7. McClintock, B. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays* / B. McClintock // *Genetics*. – 1941. – Vol. 26. – P. 234–282.
8. Егоров, Е.Е. Теломеры, теломерная ДНК, хромосомы / Е.Е. Егоров // *Биологические мембраны*. – 2001. – Vol. 18. – P. 249–256.
9. Gilson, E. How telomeres are replicated / E. Gilson, V. Geli // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2007. – Vol. 8. – P. 825–838.
10. Riethman, H. Human Telomere Structure and Biology / H. Riethman // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* – 2008. – Vol. 9. – P. 1–19.
11. Makarov, V.L. Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening / V.L. Makarov, Y. Hirose, J.P. Langmore // *Cell.* – 1997. – Vol. 88. – P. 657–666.

12. Chai, W. Human telomeres maintain their overhang length at senescence / W. Chai, J.W. Shay, W.E. Wright // *Mol. Cell. Biol.* – 2005. – Vol. 25. – P. 2158–2168.
13. Lundblad, V. Telomere maintenance without telomerase / V. Lundblad // *Oncogene.* – 2002. – Vol. 21. – P. 522–531.
14. Kalitsis, P. Mouse telocentric sequences reveal a high rate of homogenization and possible role in Robertsonian translocation / P. Kalitsis, B. Griffiths, K.H.A. Choo // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – Vol. 103. – P. 8786–8791.
15. Nucleolar organization, ribosomal DNA array stability, and acrocentric chromosome integrity are linked to telomere function / K.M. Stimpson [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – 9e92432.
16. Van Steensel, B. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions / B. van Steensel, A. Smogorzewska, T. de Lange // *Cell.* – 1998. – Vol. 92. – P. 401–413.
17. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2 / J. Karlseder [et al.] // *Science.* – 1999. – Vol. 283. – P. 1321–1325.
18. Greider, C.W. Telomerase Do D-Loop–T-Loop / C.W. Greider // *Cell.* – 1999. – Vol. 97. – P. 419–422.
19. Stansel, R.M. p53 binds telomeric single strand overhangs and t-top junctions *in vitro* / R.M. Stansel, D. Subramanian, J.D. Griffith // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 11 625–11 628.
20. Hemann, M.T. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability / M.T. Hemann // *Cell.* – 2001. – Vol. 107. – P. 67–77.
21. Samper, E. Restoration of telomerase activity rescues chromosomal instability and premature aging in *Terc*^{-/-} mice with short telomeres / E. Samper, J.M. Flores, M.A. Blasco // *EMBO Rep.* – 2001. – Vol. 2. – P. 800–807.
22. De Lange, T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres / T. de Lange // *Genes Dev.* – 2005. – Vol. 19. – P. 2100–2110.
23. Recent expansion of the telomeric complex in rodents: two distinct POT1 proteins protect mouse telomeres / D. Hockemeyer [et al.] // *Cell.* – 2006. – Vol. 126. – P. 63–77.
24. Wu, Y. MRE11–RAD50–NBS1 and ATM function as co-mediators of TRF1 in telomere length control / Y. Wu, Sh. Xiao, X-D. Zhu // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 14. – P. 832–840.
25. Human RAP1 inhibits non- 692 homologous end joining at telomeres / J. Sarthy [et al.] // *EMBO J.* – 2009. – Vol. 28. – P. 3390–3399.
26. Mammalian Rap1 controls telomere function and gene expression through binding to telomeric and extratelomeric sites / P. Martinez [et al.] // *Nat. Cell. Biol.* – 2010. – Vol. 12. – P. 768–780.
27. D’Adda di Fagagna, F. Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response / F. d’Adda di Fagagna, S.H. Teo, S.P. Jackson // *Genes Dev.* – 2004. – Vol. 18. – P. 1781–1799.
28. Boulton, S.J. Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing / S.J. Boulton, S.P. Jackson // *EMBO J.* – 1998. – Vol. 17. – P. 1819–1828.
29. Human Ku70/80 associates physically with telomerase through interaction with hTERT / W. Chai [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 7242–47 247.
30. Miller, K.M. The telomere protein Taz1 is required to prevent and repair genomic DNA breaks / K.M. Miller, J.P. Cooper // *Mol. Cell.* – 2003. – Vol. 11. – P. 303–313.
31. Bradshaw, P.S. Human telomeric protein TRF2 associates with genomic double-strand breaks as an early response to DNA damage / P.S. Bradshaw, D.J. Stavropoulos, M.S. Meyn // *Nat. Genet.* – 2005. – Vol. 37. – P. 193–197.
32. Genome-wide association study of relative telomere length / J. Prescott [et al.] // *PLoS ONE.* – 2011. – Vol. 6. – e19635.
33. Telomeric repeat-containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends / C.M. Azzalin [et al.] // *Science.* – 2007. – Vol. 318. – P. 798–801.
34. The snoRNA domain of vertebrate telomerase RNA functions to localize the RNA within the nucleus / A.A. Lukowiak [et al.] // *RNA.* – 2001. – Vol. 7. – P. 1833–1844.
35. TERRA RNA binding to TRF2 facilitates heterochromatin formation and ORC recruitment at telomeres / Zh. Deng [et al.] // *Mol. Cell.* – 2009. – Vol. 35. – P. 403–413.
36. Redon, S. The non-coding RNA TERRA is a natural ligand and direct inhibitor of human

- telomerase / S. Redon, P. Reichenbach, J. Lingner // *Nucleic Acids Res.* – 2010. – Vol. 38. – P. 5797–5806.
37. Luke, B. TERRA: telomeric repeat-containing RNA / B. Luke, J. Lingner // *The EMBO J.* – 2009. – Vol. 28. – P. 2503–2510.
38. TERRA biogenesis, turnover and implications for function / S. Feuerhahn [et al.] // *FEBS Letters.* – 2010. – Vol. 584. – P. 3812–3818.
39. Human telomeres replicate using chromosomes specific, rather than universal, replication programs / W.C. Drosopoulos [et al.] // *J. Cell Biol.* – 2012. – Vol. 197. – P. 253–266.
40. Gilson, E. How telomeres are replicated / E. Gilson, V. Géli // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2007. – Vol. 8. – P. 825–838.
41. Blackburn, E.H. Telomere states and cell fates / E.H. Blackburn // *Nature.* – 2000. – Vol. 408. – P. 53–56.
42. Smogorzewska, A. Regulation of telomerase by telomeric proteins / A. Smogorzewska, T. de Lange // *Annu. Rev. Biochem.* – 2004. – Vol. 73. – P. 177–208.
43. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization / M. Meyerson [et al.] // *Cell.* – 1997. – Vol. 90. – P. 785–795.
44. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human / T.M. Nakamura [et al.] // *Science.* – 1997. – Vol. 277. – P. 955–959.
45. The RNA component of human telomerase / J. Feng [et al.] // *Science.* – 1995. – Vol. 269. – P. 1236–1241.
46. Greider, C.W. A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis / C.W. Greider, E.H. Blackburn // *Nature.* – 1989. – Vol. 337. – P. 331–337.
47. Blackburn, E.H. Telomerases / E.H. Blackburn // *Annu. Rev. Biochem.* – 1992. – Vol. 61. – P. 113–129.
48. Егоров, Е.Е. Вокруг теломеразы / Е.Е. Егоров // *Молекулярная биология.* – Т. 33. – С. 285–392.
49. Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells / S.B. Cohen [et al.] // *Science.* – 2007. – Vol. 315. – P. 1850–1853.
50. Relationship between dyskerin expression and telomerase activity in human breast cancer / L. Montanaro [et al.] // *Cell. Oncol.* – 2008. – Vol. 30. – P. 483–490.
51. Зверева, М.Э. Теломераза: структура, функции и пути регуляции активности / М.Э. Зверева, Д.М. Щербакова, О.А. Донцова // *Успехи Биологической Химии.* – 2010. – Vol. 50. – С. 155–202.
52. A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis / A.S. Venteicher [et al.] // *Science.* – 2009. – Vol. 323. – P. 644–648.
53. TIN2-tethered TPP1 recruits human telomerase to telomeres in vivo / E. Abreu [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 2010. – Vol. 30. – P. 2971–2982.
54. Cell cycle-regulated trafficking of human telomerase to telomeres / M.P. Terns [et al.] // *Mol. Biol. Cell.* – 2006. – Vol. 17. – P. 955–965.
55. Asynchronous replication timing of telomeres at opposite arms of mammalian chromosomes / Y. Zou // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – Vol. 101. – P. 12 928–12 933.
56. Replication timing of human telomeres is chromosome arm-specific, influenced by subtelomeric structures and connected to nuclear localization / N. Arnoult [et al.] // *PLoS Genet.* – 2010. – Vol. 6. – e1000920.
57. Telomere extension occurs at most chromosome ends and is uncoupled from fill-in in human cancer cells / Y. Zhao [et al.] // *Cell.* – 2009. – Vol. 138. – P. 463–475.
58. Gilley, D. Telomere dysfunction in aging and cancer / D. Gilley, H. Tanaka // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* – 2005. – Vol. 37. – P. 1000–1013.
59. Harley, C.B. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts / C.B. Harley, A.B. Futcher, C.W. Greider // *Nature.* – 1990. – Vol. 345. – P. 458–460.
60. In situ analysis of change in telomere size during Replicative aging and cell transformation / S. Henderson [et al.] // *J. Cell. Biol.* – 1996. – Vol. 134. – P. 1–12.
61. Comparison of chromosome telomere integrity in multiple tissues from subjects at different ages / M.G. Butler [et al.] // *Cancer. Genet. Cytogenet.* – 1998. – Vol. 105. – P. 138–144.
62. Telomere length and the expression of natural telomeric genes in human fibroblasts / Y. Ning [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 2003. – Vol. 12. – P. 1329–1336.
63. Karlseder, J. Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss / J. Karlseder, A. Smogorzewska, T. de Lange // *Science.* – 2002. – Vol. 295. – P. 2446–2449.

64. Takai, H. DNA damage foci at dysfunctional telomeres / H. Takai, A. Smogorzewska, T. de Lange // *Curr. Biol.* – 2003. – Vol. 13. – P. 1549–1556.
65. De Lange T. How telomeres solve the end-protection problem / T. de Lange // *Science.* – 2009. – Vol. 326. – P. 948–952.
66. Martínez, P. Role of shelterin in cancer and aging / P. Martínez, M.A. Blasco // *Aging Cell.* – 2010. – Vol. 9. – P. 653–666.
67. Cesare, A.J. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications / A.J. Cesare, R.R. Reddel // *Nat. Rev. Genet.* – 2010. – Vol. 11. – P. 319–330.
68. Five dysfunctional telomeres predict onset of senescence in human cells / Z. Kaul [et al.] // *EMBO Rep.* – 2011. – Vol. 13. – P. 52–59.
69. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells / W.E. Wright [et al.] // *Dev. Genet.* – 1995. – Vol. 18. – P. 173–179.
70. Blackburn E.H. Switching and signaling at the telomere / E.H. Blackburn // *Cell.* – 2001. – Vol. 106. – P. 661–673.
71. Blasco, M.A. Telomeres and human disease: aging, cancer and beyond / M.A. Blasco // *Nat. Rev. Genet.* – 2005. – Vol. 6. – P. 611–622.
72. Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTRT / S.L. Weinrich [et al.] // *Nat. Genet.* – 1997. – Vol. 17. – P. 498–502.
73. Extension of lifespan by introduction of telomerase into normal human cells / A.G. Bodnar [et al.] // *Science.* – 1998. – Vol. 279. – P. 349–353.
74. Donate, L.E. Telomere in cancer and aging / L.E. Donate, M.A. Blasco // *Phil. Trans R. Soc. B.* – 2011. – Vol. 266. – C. 76–84.
75. Reprogramming of telomeric regions during the generation of human induced pluripotent stem cells and subsequent differentiation into fibroblastlike derivatives / S. Yehezkel [et al.] // *Epigenetics.* – 2011. – Vol. 6. – P. 63–75.
76. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors / K. Takahashi [et al.] // *Cell.* – 2007. – Vol. 131. – P. 1–12.
77. Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells / R.M. Marion [et al.] // *Stem Cell.* – 2009. – Vol. 4. – P. 141–154.
78. Different telomere length dynamics at the inner cell mass versus established embryonic stem (ES) cells / E. Varela [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2011. – Vol. 108. – P. 15 207–15 212.
79. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA / M.A. Blasco [et al.] // *Cell.* – 1997. – Vol. 91. – P. 25–34.
80. Kipling, D. Hypervariable ultra-long telomeres in mice / D. Kipling, H.J. Cooke // *Nature.* – 1990. – Vol. 347. – P. 400–402.
81. Shay, J.W. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase / J.W. Shay, W.E. Wright // *Carcinogenesis.* – 2005. – Vol. 26. – P. 867–874.
82. Hayflick, L. The serial cultivation of human diploid cell strains / L. Hayflick, P.S. Moorhead // *Exp. Cell. Res.* – 1961. – Vol. 25. – P. 595–621.
83. Hayflick, his limit, and cellular ageing / J.W. Shay, W.E. Wright // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2000. – Vol. 1. – P. 72–76.
84. Shay, J.W. Telomerase: a target for cancer therapeutics / J.W. Shay, W.E. Wright // *Cancer Cell.* – 2002. – Vol. 2. – P. 257–265.
85. Shay, J.W. Telomeres and telomerase in normal and cancer stem cells / J.W. Shay, W.E. Wright // *FEBS Letters.* – 2010. – Vol. 584. – P. 3819–3825.
86. Blasco, M.A. Telomere length, stem cells and aging / M.A. Blasco. – *Nat. Chem. Biol.* – 2007. – Vol. 3. – P. 640–649.
87. Control of human telomere length by TRF1 and TRF2 / A. Smogorzewska [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 2000. – Vol. 20. – P. 1659–1668.
88. Loayza, D. POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control / D. Loayza, T. de Lange // *Nature.* – 2003. – Vol. 423. – P. 1013–1018.
89. Marian, C.O. The effects of telomerase inhibition on prostate tumor-initiating cells / C.O. Marian, W.E. Wright, J.W. Shay // *Int. J. Cancer.* – 2010. – Vol. 127. – P. 321–331.
90. Reddel, R.R. Alternative lengthening of telomeres, telomerase, and cancer / R.R. Reddel // *Cancer Lett.* – 2003. – Vol. 194. – P. 155–162.
91. Control of telomere length by a trimming mechanism that involves generation of t-circles / H.A. Pickett [et al.] // *EMBO J.* – 2009. – Vol. 28. – P. 799–809.
92. Lustig, A.J. Clues to catastrophic telomere loss in mammals from yeast telomere rapid deletion / A.J. Lustig // *Nat. Rev. Genet.* – 2003. – Vol. 4. – P. 916–923.

93. Watson, J.M. Telomere rapid deletion regulates telomere length in *Arabidopsis thaliana* / J.M. Watson, D.E. Shippen // *Mol. Cell. Biol.* – 2007. – Vol. 27. – P. 1706–1715.
94. Normal mammalian cells negatively regulate telomere length by telomere trimming / H.A. Pickett [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 2011. – Vol. 20. – P. 4684–4892.
95. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity / T.M. Bryan [et al.] // *EMBO J.* – 1995. – Vol. 14. – P. 4240–4248.
96. Henson, J.D. Assaying and investigating Alternative Lengthening of Telomeres / J.D. Henson, R.R. Reddel // *FEBS Lett.* – 2010. – Vol. 584. – P. 3800–3811.
97. Absence of a telomere maintenance mechanism as a favorable prognostic factor in patients with osteosarcoma / G.A. Ulaner [et al.] // *Cancer Res.* – 2003. – Vol. 63. – P. 1759–1763.
98. Dynamics of telomeres and PML nuclear bodies in a telomerase negative human cell line / T. Jegou [et al.] // *Mol. Biol. Cell.* – 2009. – Vol. 20. – P. 2070–2082.
99. Molecular characterization of inter-telomere and intra-telomere mutations in human ALT cells / H. Varley [et al.] // *Nat. Genet.* – 2002. – Vol. 30. – P. 301–305.
100. Probing PML body function in ALT cells reveals spatiotemporal requirements for telomere recombination / I. Draskovic [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2009. – Vol. 106. – P. 15 726–15 731.
101. Alternative lengthening of telomeres is characterized by high rates of telomeric exchange / J.A. Londono-Vallejo [et al.] // *Cancer Res.* – 2004. – Vol. 64. – P. 2324–2327.
102. Bailey, S.M. Frequent recombination in telomeric DNA may extend the proliferative life of telomerase-negative cells / S.M. Bailey, M.A. Brenneman, E.H. Goodwin // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – Vol. 32. – P. 3743–3751.
103. Telomerase suppresses formation of ALT-associated single-stranded telomeric C-circles / M.J. Plantinga [et al.] // *Mol. Cancer Res.* – 2013. – Vol. 11. – P. 557–567.
104. Telomere length maintenance –an Alternative mechanism / N.J. Royle [et al.] // *Cytogenet. Genome Res.* – 2008. – Vol. 122. – P. 281–291.
105. Nabetani, A. Unusual telomeric DNAs in human telomerase-negative immortalized cells / A. Nabetani, F. Ishikawa // *Mol. Cell. Biol.* – 2009. – Vol. 29. – P. 703–713.
106. Cesare, A.J. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications / A.J. Cesare, R.R. Reddel // *Nat. Rev. Genet.* – 2010. – Vol. 11. – P. 319–330.
107. Nabetani, A. Alternative lengthening of telomeres pathway: Recombination-mediated telomere maintenance mechanism in human cells / A. Nabetani, F. Ishikawa // *J. Biochem.* – 2011. – Vol. 149. – P. 5–14.
108. Teng, S.C. Telomere–telomere recombination is an efficient bypass pathway for telomere maintenance in *Saccharomyces cerevisiae* / S.C. Teng, V.A. Zakian // *Mol. Cell. Biol.* – 1999. – Vol. 19. – P. 8083–8093.
109. RAD51 and RAD50 define two pathways that collaborate to maintain telomeres in the absence of telomerase / S. Le [et al.] // *Genetics.* – 1999. – Vol. 152. – P. 143–152.
110. Takata, H. Late S phase-specific recruitment of Mre11 complex triggers hierarchical assembly of telomere replication proteins in *Saccharomyces cerevisiae* / H. Takata, Y. Tanaka, A. Matsuura // *Mol. Cell.* – 2005. – Vol. 18. – P. 573–583.
111. McEachern, M.J. Break-induced replication and recombinational telomere elongation in yeast / M.J. McEachern, J.E. Haber // *Annu. Rev. Biochem.* – 2006. – Vol. 75. – P. 111–135.
112. Suppression of alternative lengthening of telomeres by Sp100-mediated sequestration of the MRE11/RAD50/NBS1 complex / W.Q. Jang [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 2005. – Vol. 25. – P. 2708–2721.
113. Involvement of replicative polymerases, Tel1p, Mec1p, Cdc13p, and the Ku complex in telomere-telomere recombination / Y.L. Tsai [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 2002. – Vol. 22. – P. 5679–5687.
114. Potts, P.R. The SMC5/6 complex maintains telomere length in ALT cancer cells through SUMOylation of telomere-binding proteins / P.R. Potts, H. Yu // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 14. – P. 581–590.
115. Nabetani, A. Localization of hRad9, hHus1, hRad1, and hRad17 and caffeine-sensitive DNA replication at the alternative lengthening of telomeres-associated promyelocytic

- leukemia body / A. Nabetani, O. Yokoyama, F. Ishikawa // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 25 849–25 857.
116. DNA C-circles are specific and quantifiable markers of alternative-lengthening-of-telomeres activity / J.D. Henson [et al.] // *Nature Biotechnology.* – 2009. – Vol. 27. – P. 1181–1185.
117. Morrish, T.A. Short telomeres initiate telomere recombination in primary and tumor cells / T.A. Morrish, C.W. Greider // *PLoS Genet.* – 2009. – Vol. 5. – e1000357.
118. Repression of an alternative mechanism for lengthening of telomeres in somatic cell hybrids / K. Perrem [et al.] // *Oncogene.* – 1999. – Vol. 18. – P. 3383–3390.
119. ALT Starr Cancer Consortium. Loss of ATRX, Genome Instability, and an Altered DNA Damage Response Are Hallmarks of the Alternative Lengthening of Telomeres Pathway / C.A. Lovejoy [et al.] // *PLoS Genet.* – 2012. – Vol. 8. – e1002772.
120. Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations / C.M. Heaphy [et al.] // *Science.* – 2011. – Vol. 333. – P. 425.
121. Co-existence of alternative lengthening of telomeres and telomerase in hTERT-transfected GM847 cells / K. Perrem [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 2001. – Vol. 21. – P. 3862–3875.
122. Grobelny, J.V. Effects of reconstitution of telomerase activity on telomere maintenance by the alternative lengthening of telomeres (ALT) pathway / J.V. Grobelny, M. Kulp-McEliece, D. Broccoli // *Hum. Mol. Genet.* – 2001. – Vol. 10. – P. 1953–1961.
123. Telomere lengthening early in development / L. Liu [et al.] // *Nat. Cell. Biol.* – 2007. – Vol. 9. – P. 1436–1441.
124. Recombinogenic telomeres in diploid *Sorex granarius* (Soricidae, Eulipotyphla) fibroblast cells / N. Zhdanova [et al.] // Accepted by MCB01697-13R2. – 2014.
125. Nuclear and territorial topography of chromosome telomeres in human lymphocytes. *Exp. Cell. Res.* / J. Amrichova [et al.] // 2003. – Vol. 289. – P. 11–26.
126. Three-dimensional arrangements of centromeres and telomeres in nuclei of human and murine lymphocytes / C. Weierich [et al.] // *Chromosome Res.* – 2003. – Vol. 11. – P. 485–502.
127. Structure, subnuclear distribution, and nuclear matrix association of the mammalian telomeric complex / M.E. Luderus [et al.] // *J. Cell. Biol.* – 1996. – Vol. 135. – P. 867–881.
128. DNA moves sequentially towards the nuclear matrix during DNA replication *in vivo* / J.C. Rivera-Mulia [et al.] // *BMC Cell. Biology.* – 2011. – Vol. 12. – P. 3.
129. The heterochromatic chromosome caps in great apes impact telomere metabolism / C. Novo [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2013. – Vol. 41. – P. 4792–4801.
130. The nuclear lamina promotes telomere aggregation and centromere peripheral localization during senescence of human mesenchymal stem cells / V. Raz [et al.] // *J Cell Sci.* – 2008. – Vol. 121 (Pt 24). – P. 4018–4028.
131. Ebrahimi, H. Release of yeast telomeres from the nuclear periphery is triggered by replication and maintained by suppression of Ku-mediated anchoring / H. Ebrahimi, A.D. Donaldson // *Genes Dev.* – 2008. – Vol. 22. – P. 3363–3374.
132. Трехмерная организация интерфазных ядер фибробластов у двух близкородственных видов бурозубок, различающихся структурой терминальных районов хромосом / Н.Б. Рубцов [и др.] // *Цитология.* – 2008. – Т. 50. – С. 430–438.
133. Scherthan, H. Rap1-independent telomere attachment and bouquet formation in mammalian meiosis / H. Scherthan, A. Sfeir, T. de Lange // *Chromosoma.* – 2011. – Vol. 120. – P. 151–157.
134. Telomere length regulation in mice is linked to a novel chromosome locus / L. Zhu [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – Vol. 21. – P. 8648–8653.
135. Hemann, M.T. Wild-derived inbred mouse strains have short telomeres / M.T. Hemann, C.W. Greider // *Nucleic Acids Res.* 2000. 28. P.4474-4478.
136. Unusual distribution pattern of telomeric repeats in the shrews *Sorex araneus* and *Sorex granarius* / N.S. Zhdanova [et al.] // *Chromosome Res.* – 2005. – Vol. 13. – P. 617–625.
137. The very long telomeres in *Sorex granarius* (Soricidae, Eulipotyphla) contain ribosomal DNA / N.S. Zhdanova [et al.] // *Chromosome Res.* – 2007. – Vol. 15. – P. 881–890.
138. Распределение теломерной ДНК в хромосомах обыкновенной бурозубки *Sorex araneus*, *EULIPOTHYPHILA* / Н.С. Жданова [и др.] // *Цитология.* – 2009. – Т. 51. – С. 577–584.

139. Influence of inbreeding and genetics on telomere length in mice / E.L. Manning [et al.] // *Mamm. Genom.* – 2002. – Vol. 13. – P. 234–238.
140. Regulation of murine telomere length by Rtel: An essential gene encoding a helicase-like protein / H. Ding [et al.] // *Cell.* – 2004. – Vol. 117. – P. 873–886.
141. Inherited mutations in the helicase RTEL1 cause telomere dysfunction and Hoyer-aal-Hreidarsson syndrome / Z. Deng [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2013. – Vol. 110. – P. E3408–416.
142. RTEL1: an essential helicase for telomere maintenance and the regulation of homologous recombination / E.-J. Uringa [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2011. – Vol. 39. – P. 1647–1655.
143. Slagboom, P.E. Genetic determination of telomere size in humans: a twin study of three age groups / P.E. Slagboom, S. Droog, D.I. Boomsma // *Am. J. Hum. Genet.* – 1994. – Vol. 55. – P. 876–882.
144. The pattern of chromosome-specific variations in telomere length in humans shows signs of heritability and is maintained through life / J. Graakjaer [et al.] // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 2006. – Vol. 1067. – P. 311–316.
145. Mapping of a major locus that determines telomere length in humans / M. Vasa-Nicotera [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2005. – Vol. 76. – P. 147–151.
146. A regulatory SNP of the BICD1 gene contributes to telomere length variation in humans / M. Mangino [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 2008. – Vol. 17. – P. 2518–2523.
147. OB fold-containing protein 1 (OBFC1), a human homolog of yeast Stn1, associates with TPP1 and is implicated in telomere length regulation / M. Wan [et al.] // *Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284. – P. 26 725–26 731.
148. Genome-wide association identifies OBFC1 as a locus involved in human leukocyte telomere biology / D. Levy [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – Vol. 107. – P. 9293–9298.
149. Hills, M. Short telomeres resulting from heritable mutations in the telomerase reverse transcriptase gene predispose for a variety of malignancies / M. Hills, P.M. Lansdorp [et al.] // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2009. – Vol. 1176. – P. 178–190.
150. Genetic variation in human telomerase is associated with telomere length in Ashkenazi centenarians / G. Atzmon [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – Vol. 107. – P. 1710–1717.
151. Prowse, K.R. Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length / K.R. Prowse, C.W. Greider // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1995. – Vol. 92. – P. 4818–4822.
152. Comparative biology of mammalian telomeres: hypotheses on ancestral states and the roles of telomeres in longevity determination / N.M. Gomes [et al.] // *Aging Cell.* – 2011. – Vol. 10. – P. 761–768.

Дата поступления статьи 26 октября 2014 г.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ДОМЕСТИКАЦИИ

Обзорная статья

Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук
Российская Федерация, 630090, г. Новосибирск, пр-т ак. Лаврентьева, 10

Чарлз Дарвин в «Происхождении видов...» (1859 г.) и в книге: «Прирученные животные и возделанные растения» (переводной русский вариант – 1867 г.) первым поставил научную проблему о происхождении домашних животных и культурных растений и их огромном разнообразии. И хотя со времени выхода в свет этих книг миновало уже более 150 лет, вопрос о ключевых механизмах эволюционного процесса в условиях domestikации до конца не выяснен.

Факторы и источники domestikационных метаморфоз не вскрыты вследствие огромного срока (около 15 тыс. лет), отделяющего первые этапы одомашнивания от научно осознанной селекции животных. Разнообразные исторические и палеонтологические свидетельства указывают на то, что именно на самых начальных этапах этого процесса произошли те ключевые изменения, которые придали всей дальнейшей эволюции небывалый размах и невиданные темпы [1–6].

За всю историю domestikации диких видов животных лишь около пятидесяти стали домашними. Из многочисленных хищных ими оказались представители только двух семейств – собака и кошка, непарнокопытных тоже два – осел и лошадь. Парнокопытных и мозолоногих больше: корова, коза, овца, свинья, як, верблюд, лама, буйвол, олень. Из зайцеобразных – лишь кролик. Два насекомых – шелковичный червь и пчела. Два обитателя вод – карп и золотая рыбка. Более всего птиц, но также не так уж много: куры, утки, гуси, индюшки, цесарки, голуби, канарейки, японский перепел. Только что в новейшей истории началась domestikация пушных зверей: лисиц, песцов, енотовидных собак, норок, хорьков, соболей, нутрий, сурков, шиншиллы [7–13].

Все эволюционные последствия одомашнивания наиболее ярко видны на примере собак, ископаемые костные останки которых

оцениваются в 12–15 тыс. лет. В первую очередь глубокое наследственное преобразование претерпело их поведение: исчезло злобное отношение к человеку и страх перед ним, все поведение основывается на доверии, привязанности и преданности. Возникла также широкая изменчивость других форм поведения, благодаря которым собаки работают пастухами, сторожами, охотниками, несут службу в уголовном розыске, помогают инвалидам быть социально адаптированными.

Domestikация собаки – совсем недавнее событие на эволюционной шкале, но глядя на таксу, левретку или пекинеса, трудно представить, что родословная существующих пород собак восходит к стандартным, единообразным особям одного вида – *Canis lupus*. И все же они являются полной родней – после спаривания у них появится плодовитое потомство. На это указывают и комплексные результаты сравнительного анализа хромосом, поведения, морфологии, вокализации, а на настоящем этапе – и результаты молекулярно-генетического сравнения.

Как удалось человеку оторвать от древа волчьей природы росток и вынянчить из него собаку – антагониста волка и верного друга людей? Что сделало собаку такой? Что происходило в течение ее тысячелетней эволюции? Ведь мутационная скорость большинства функциональных генов оценивается как 10^{-5} мутаций на гамету на поколение. Весьма дискуссионна и роль стохастических процессов в создании этого разнообразия.

Существуют разные сценарии начала domestikации [14]. Согласно одним из них, инициатива одомашнивания принадлежала человеку, когда на самых начальных этапах исторической domestikации диких животных решающую роль играл бессознательный отбор: человек сохранял наиболее контактных и приятных животных и пренебрегал другими, без осо-

знанного намерения изменить генетическую природу животных. В других сценариях отдельные представители диких животных сами начинали осваивать новую экологическую нишу вблизи стоянок первобытного человека, т. е. происходила их «самодоместикация». Но каким бы ни был исторический сценарий начала domestikации, вполне вероятно, что участвовали в них не проявлявшие к человеку агрессивности или страха особи. Подтверждением тому служат ископаемые кости волков, которые находили вместе с костями архаичного *Homo sapiens* 300–400 тыс. лет до Н.Э. Первая группа таких основателей будущих примитивных собак могла быть сильно инбридирована и подвержена процессам генетического дрейфа. Размноженная в числе эта начальная популяция могла дать в последующем все имеющееся в мире разнообразие собак. Основанием такой точки зрения послужили исследования мтДНК, которые выявили небольшое число митохондриальных родословных, что могло указывать на ограниченное число основателей domestikационных событий. Но в то же время не было найдено корреляции между гаплотипами митохондриальной ДНК и породной принадлежностью собак. Это может служить свидетельством того, что породная дифференциация начиналась и происходила в генетически разнообразных популяциях примитивных пород, которые были широко распространены по всему миру. К тому же было выявлено большое генетическое разнообразие собак на уровне ядерной ДНК (например, микросателлитных локусов, аллелей белков, аллелей главного комплекса гистонесовместимости MHC). Это допускает, что генетический пул современных собак произошел от разнообразного генного пула, что в свою очередь может указывать на независимые события одомашнивания волка в разных местах и в разное время [15].

Изучение ранней domestikации традиционно основывается на косвенных данных. Основным его источником служат археологические и культурно-исторические материалы, по которым трудно воссоздать начальный период одомашнивания. И все же смоделировать процесс domestikации в длительных экспериментах возможно, вовлекая в него новые виды. При этом главным критерием возможности одомашнивания изначально дикого вида будет

служить успешность его размножения в новой для него стрессующей антропогенной среде, когда дистанция между диким животным и человеком сокращается до расстояния вытянутой руки. Ведь в природной среде поведение диких животных при контакте с человеком характеризуется, как правило, «дистанцией избегания».

Возникает вопрос, что представляет собой способность к domestikации? Определяется ли она только генетически, или животные, плененные в раннем возрасте, импринтируются путем ассоциации себя в определенном сообществе?

Домestikация представляет собой процесс, при котором популяция животных адаптируется к антропогенной среде посредством комбинации генетических изменений, протекающих в последовательном ряду поколений. При этом на первом этапе адаптационного процесса наиболее существенную роль играло поведение – стрессуемость и стрессоустойчивость.

Для анализа генетических эффектов domestikации используются в основном два подхода:

1. Сравнение существующих диких и домашних представителей определенных видов;
2. Прослеживание в ряду поколений изменений в популяциях диких животных, попавших в условия разведения в неволе без направленного отбора по поведению.

Сравнение нынешних домашних животных с их дикими сородичами все же недостаточно надежно, поскольку все еще не до конца выяснена родословная большинства domestikированных видов. К тому же некоторые дикие предки ныне существующих домашних видов вымерли. Даже если и существует дикая предковая популяция, ее фенетические характеристики невозможно экстраполировать на весь вид, а существование огромного количества пород одомашненных видов и географическое разнообразие существующих популяций осложняет выбор представителей для сравнительного изучения. Хотя сравнительный метод и накопил большой экспериментальный материал, он все еще пока не дал достаточный объем информации о том, как происходили формообразовательные процессы в ходе domestikации; в лучшем случае он только выявил различия между дикими и домашними популяциями.

В противоположность сравнительному методу, пролонгированный подход в разведении в условиях неволи изъятых из природы популяций диких видов способен дать больше информации относительно эффектов domestikации и тех генетических механизмов, которые сопровождают ее ход. При этом открывается возможность регистрации изменений поведения и других фенотипических свойств в ряду поколений, с какой скоростью идет domestikация при разных векторах искусственного отбора.

Наиболее показательным примером пролонгированного подхода является промышленная domestikация пушных зверей на специализированных зверофермах. Известно, какими принципами руководствовались первые заводчики. Мы можем ответить на такой вопрос, – какие звери были взяты человеком в культуру первыми? Это были красные лисицы, которых начали содержать в неволе еще в XVII веке монахи Соловецкого монастыря. Где шел отбор? Он связан с центрами domestikации лисиц, песцов, норок, соболей и нутрий в Северной Америке и России. С какой скоростью? Он связан с темпами domestikационных преобразований различных видов одомашниваемых пушных зверей, подробно зафиксированных в племенных книгах. Точно известно, по каким признакам преимущественно шел отбор, каковы его темпы, интенсивность, напряженность и направление [16, 17].

В дополнение к пролонгированному подходу в исследовании процесса domestikации была предпринята попытка выделить «гены domestikации», под которыми понимались плейотропные эффекты на поведение генов, затрагивающих окраску волосяного покрова. К примеру, было обнаружено, что ручное поведение у лабораторизированных норвежских крыс связано с рецессивным аллелем *неагути* (*black*), гомозиготность по которому обеспечивает лучшую приручаемость по сравнению с крысами *агути*. Позже, этот же эффект был зафиксирован у разных окрасочных форм лисиц, выращиваемых в условиях звероводческих ферм. Было показано, что дистанция избегания, проявляемая по отношению к человеку лисицами, была обратной по отношению к количеству мутантных аллелей окраски в генотипе [18].

Экспериментальная domestikация серебристо-черных лисиц. Школа академика Д.К. Беляева

Моделирование процесса domestikации на представителе семейства *Canidae*, заложенное академиком Д.К. Беляевым в конце 1950-х–начале 1960-х годов XX века, служит принципиально новым направлением в изучении генетико-эволюционных механизмов domestikации. Был предложен оригинальный подход, позволяющий ускорить начальный период одомашнивания, соизмерив его с продолжительностью человеческой жизни и благодаря этому увидеть самые начальные, исходные моменты в domestikационных преобразованиях диких форм животных. Идея этого подхода состояла в организации контролируемого селекционного эксперимента и опиралась на принцип коррелятивной изменчивости как на творческий метод наследственного преобразования организмов в заранее указанном направлении. Д.К. Беляев подошел к эволюционной роли коррелятивной изменчивости с позиций анализа исторического становления корреляционных систем организма, т.е. их биологического значения. Он подчеркивал, что главную роль в эволюции и селекции играют коррелятивные связи, входящие в эволюционно сложившуюся систему регуляции онтогенеза [19]. При этом в условиях domestikации, особенно на первых ее этапах, существенную роль играл отбор по поведению, по способности элиминировать комплекс эмоционально-отрицательных, агрессивно-трусливых реакций на человека, свойственных диким животным, и формировать эмоционально-положительные реакции на него, характерные для домашних животных, то есть на способность к одомашниванию.

Экспериментальная проработка этой гипотезы вот уже в течение пяти десятилетий успешно воспроизводится на представителе семейства собачьих – серебристо-черной лисице (*Vulpes vulpes*), разводимой на звероводческих фермах. Сущность эксперимента состоит в длительном систематическом интенсивном отборе лисиц на приручаемость, который существенно ускоряет процесс domestikации. Безусловно, одомашнивание этого объекта пушного звероводства осуществляется механизмом естественного отбора и в условиях звероводческих хозяйств,

где целенаправленного искусственного отбора по поведению не ведется. Однако темпы этого процесса несопоставимы с таковыми в условиях сознательного жесткого отбора на domestикацию.

В ходе этого эксперимента накоплены факты, свидетельствующие о том, что генетическое преобразование поведения вызывает глубокую морфо-физиологическую трансформацию животных селекционируемой популяции. Происходит перестройка целого комплекса приспособительных сезонных биологических функций. Причем она идет в том же направлении, в каком изменялись эти функции у ранее одомашненных животных, возникают те же самые коррелированные морфологические изменения, какие давно были получены в ходе исторического одомашнивания. Данные эволюционных последствий domestикации лисиц Д.К. Беляев рассматривал как эффект специфического отбора по поведению. Этот специфический отбор осуществляет не только функцию движущего отбора, изменяя селекционируемый признак – поведение, но и дестабилизирующую – в отношении стабилизированного предшествующей эволюцией физиологического и морфологического фенотипа [20].

Д.К. Беляев проявлял большой интерес к формообразовательным последствиям дестабилизирующего отбора у животных разного уровня организации. Поскольку в основе концепции дестабилизирующего отбора лежат представления о роли регуляторных систем развития, можно думать, что по мере усложнения организации эволюционные последствия дестабилизирующего отбора будут более глубокими. Так, на высоте организации человека регуляторные системы развития могли иметь совершенно несопоставимое с другими ветвями филогенетического древа эволюционное значение [21].

Степень сложности морфогенетических корреляций, лежащих в основе стабилизации фенотипа, вероятно, также разная у животных с разной степенью сложности биоценологических взаимоотношений и разного уровня экологической пластичности. Малоспециализированные исходные формы, занимающие обширный и экологически сложный ареал с колеблющимися и разнообразными условиями жизни, к како-

вым можно отнести лисицу, должны обладать большими эволюционными потенциями. Например, И.И. Шмальгаузен к таковым относит также исходные формы, давшие собаку, овцу, домашнюю курицу – именно среди них наблюдается большое разнообразие пород. В качестве иллюстрации эволюционных последствий domestикации форм, специализированных к относительно однообразным экологическим нишам, он называет утку и гуся – перелетных птиц с периодически жестким отбором, а также лошадь – специализированное травоядное животное с острой зимней элиминацией [22]. К таковым можно отнести и американскую норку (*Mustela vison* Schreber, 1777).

Дестабилизирующие эффекты экспериментальной domestикации

Хорошо известно, что ответ на отбор по любому количественному признаку не ограничивается изменением только селекционируемого признака. Разнообразные коррелированные ответы являются обычным последствием селекционных экспериментов. Известно, что характер коррелированных ответов популяции на отбор по тому или иному признаку во многом зависит от первоначальной генетической структуры популяции. Действительно, отбор опирается на случайно возникающие мутации, которые в разных популяциях могут быть разными. Поэтому коррелированные изменения при отборе трудно предсказать. При одном и том же векторе отбора они могут быть разными в разных популяциях и могут не воспроизводиться при повторном отборе, в другой исходной популяции.

В чем специфичность коррелированных ответов при domestикации?

В многолетнем эксперименте Д.К. Беляева и Л.Н. Трут по отбору на domestикационное поведение серебристо-черных лисиц была смоделирована эволюционная ситуация, имевшая место в ходе исторического процесса одомашнивания изначально диких животных: возникновение особенностей коммуникативного поведения, повышающего адаптацию к антропогенной среде, характерное для домашних собак; появление морфологических и физиологических изменений, также характерных для домашних собак; появление на кожно-меховом покрове характерных морфологических мар-

керов domestikации – пегостей, как следствие замедления темпов развития эмбриональных предшественников меланоцитов или первичных меланобластов [14].

Известно, что одомашнивание одного и того же вида животных происходило неоднократно в разных местах и в разное время, т. е. в исходном материале, используемом при первоначальной domestikации, должны существовать генетические различия. И уж тем более они должны существовать между разными семействами (например, кошачьи и собачьи), отрядами (хищники, копытные, грызуны) и классами (млекопитающие и птицы). Но, тем не менее, у представителей разных систематических групп, даже очень удаленных друг от друга, наблюдается глубокий параллелизм в темпах, размахе и характере изменений поведения, физиологии, морфологии. Характеризуя параллелизм размаха и темпов преобразований, Ч. Дарвин в свое время писал: «В каком бы климате и для какой бы цели их (домашних животных) не держали, – в качестве ли пищи для человека, для езды или охоты, для одежды или только для забавы – при всех этих обстоятельствах сложились расы, сильнее отличающиеся друг от друга, чем формы, которые в природном состоянии считаются отдельными видами» [23].

Наряду с высокими темпами изменения домашних животных, наблюдается фенотипический параллелизм в характере их морфологической трансформации. Так, у всех домашних животных претерпела коренное преобразование функция размножения; утрачен характерный для диких представителей сезонный ритм воспроизведения потомства и приобретена способность размножаться в любое время года (с соответственно учащенной кратностью размножения) и существенно возрос уровень фактической плодовитости. Эти изменения репродуктивных показателей прослеживаются у всех животных, независимо от их систематической принадлежности, вовлеченных в процесс одомашнивания в историческом прошлом или вовлекаемых в новейшей человеческой истории.

Наблюдается удивительный параллелизм и в возникновении отклонений от стандартной окраски волосяного покрова, и, прежде всего, в появлении депигментированных пятен на од-

них и тех же участках туловища у представителей разных групп организмов. Почти у всех домашних животных возникают структурные изменения волосяного покрова: регистрируется появление курчавости волоса, удлинение волоса по ангорскому типу, или, наоборот, сильное его укорочение [24]. Практически у всех одомашненных видов имеются породы-карлики и породы-великаны; а также породы с измененными пропорциями тела; различные деформации осевого скелета (укорочение и искривление хвоста). В строении костей черепа у млекопитающих, птиц и даже у аквариумных рыб обнаруживается явление «бульдожистости», что послужило даже для создания пород, с такой особенностью строения черепа (например, порода «ниата» у крупного рогатого скота).

Уже достаточно долго археологический материал свидетельствует о том, что все эти изменения возникали на заре domestikации. Опираясь на явление высокой изменчивости домашних животных, человек последующей селекцией, систематическим искусственным отбором, эффективность которого росла по мере развития человеческой культуры и увеличения численности разводимых животных, создал формы домашних животных, резко отличающихся друг от друга по многим признакам. Необычным обстоятельством явилось то, что перестройка поведения в процессе domestikации сопровождалась резким увеличением изменчивости по многим другим признакам и функциям, которые, казалось бы, с поведением непосредственно не связаны. Это касалось многих морфологических признаков, воспроизводительной функции, гормональных характеристик. Д.К. Беляев писал по этому поводу: «Основу понимания причин, темпа и характера наблюдаемой нами изменчивости надо искать, очевидно, в специфике той функциональной системы, которая непосредственно стала объектом отбора, и состояние которой служило главным критерием селекции животных на самых первых этапах их domestikации» [25].

Д.К. Беляев объяснял такие высокие темпы формообразовательного процесса при одомашнивании, а также гомологичный характер возникающей изменчивости вектором отбора на поведение, который рассматривался как основной фактор эволюционных преобразований домашних животных [19–25].

Нейрогормональные аспекты domestikации

Объектом отбора при domestikации, прежде всего, является нейрогормональная система, участвующая в регуляции, как поведения, так и многих других функций и систем организма и, что особенно важно, процесс его онтогенетического развития. Селекция велась не по каким-либо частным характеристикам нервной системы, а по таким, как уровень страха и тревожности, агрессивности, исследовательской мотивации, наконец, по способности адаптироваться к новой социальной среде, т.е. по весьма важным свойствам, непосредственно связанным с уровнем стресс-реактивности. Учитывая также то, что отбор шел в провокационных условиях тесного общения с человеком, т.е. фактически в условиях стресса, можно представить себе, что стресс был важным фактором данного селекционного процесса. Как предположил Д.К. Беляев, именно отбор в условиях стресса, затрагивающий главные нейрогормональные регуляторные системы, стал причиной того каскада изменчивости, который наблюдается в процессе domestikации. По-видимому, стресс и возникающая при этом дестабилизация гомеостаза могут быть важным механизмом мобилизации скрытой генетической изменчивости. Кроме того, как было выяснено, частота мутирования и вероятность рекомбинаций могут увеличиваться в условиях стресса [26]. Таким образом, отбор, затрагивающий основные системы регуляции гомеостаза, может генерировать сильнейшее увеличение изменчивости, вследствие чего он был назван Д.К. Беляевым дестабилизирующим.

По существу, функцией такого отбора является мобилизация генетической изменчивости, что сопровождается дестабилизацией онтогенеза, разрушением старых корреляционных связей и появлением множественных морфофункциональных отклонений. Представление о дестабилизирующем отборе, безусловно, является новым и важным для понимания эволюционного процесса, протекающего в необычных, экстремальных условиях.

Проводимый отбор в отношении селекционируемого признака – поведения – является движущим, т.к. меняет селекционируемый признак только в одном направлении. Однако

он выполняет дестабилизирующую функцию не только в отношении высоко стабилизированных естественным отбором сезонных биологических функций, но и в отношении морфологических признаков. Поэтому он и был назван «дестабилизирующий» [19–25].

Специфика свойств поведения состоит в том, что системы, регулирующие эти свойства, скоррелированы с системами регуляции онтогенеза, поэтому отбор по ним должен неизбежно вызывать дестабилизацию этих систем, сопровождающихся глубокими изменениями различных звеньев гормональной и нейро-медиаторных систем и корреляционных отношений между ними. Под дестабилизирующим отбором понимается отбор, вызывающий дестабилизацию регуляторных систем онтогенеза и, как следствие, дестабилизацию морфо-физиологической организации.

В условиях domestikации один и тот же вектор отбора меняет регуляторную систему в одном и том же направлении. Так, есть основание полагать, что при одомашнивании животных гормональные и нейро-химические регуляторные механизмы реорганизуются в одном направлении. Экспериментально показано не только на лисах, но и на других модельных объектах (крысах-пасюках и американских норках), что domestikация ведет к снижению функциональной активности гипофизарно-надпочечниковой системы и повышению гипофизарно-гонадной. По-видимому, универсальным, не зависимым от систематической принадлежности животных, является изменение в процессах domestikации некоторых нейро-химических (серотониновых и норадреналиновых) механизмов головного мозга.

Domestikация вовлекает в сферу своего действия не только гормональные, но также и нейротрансмиттерные системы онтогенеза. Хотя роль нейротрансмиттеров в регуляции развития обсуждается давно, она сравнительно недавно вновь поднималась в коллективном обзоре, опубликованном в “Development Neuroscience” [27]. Но в связи с проблемой domestikации особого внимания заслуживает серотониновая система мозга. Ее участие в ингибировании агрессивного поведения животных освещалось в “BioEssays” [28].

Молекулярные механизмы domestikации

Ч. Дарвин в свое время обратил внимание на появление особой пластичности организмов при попадании их в необычные условия. Он писал: «Во всяком случае, нет сомнения, что измененные условия производят почти неопределенную сумму колеблющейся изменчивости, вследствие чего вся организация становится до некоторой степени пластичной» [29]. О такой же мобилизации неопределенной изменчивости при попадании в необычные условия (при domestikации) писал генетик-эволюционист Д.К. Беляев, который полагал, что особенности эволюции домашних животных определялись именно вектором отбора на поведение. Сама domestikация рассматривалась им как процесс больших изменений в регуляции генетической активности, происходящих в результате отбора по поведению. Ведь морфологические изменения, возникавшие *de novo* у серебристо-черных лисиц в ходе их экспериментальной domestikации, трудно было интерпретировать с позиций мутационных изменений отдельных генов, контролирующих отдельные признаки. Эта сложность интерпретации возникала при оценке как самого характера появления морфологических новшеств, так и результатов их классического гибридологического анализа. Результаты генетического анализа также указывали на то, что под разными морфологическими изменениями может быть одна и та же генетическая основа: в анализирующих скрещиваниях родителей, несущих тот или иной признак, вместо потомков ожидаемого фенотипа рождаются потомки с совсем другими признаками. Вероятнее всего, формообразовательные процессы в ходе экспериментальной domestikации лисиц, крыс-пасюков и американских норок отражают изменения в процессе отбора регуляторных генов, выполняющих множественные функции в процессе развития, или гены транскрипционных факторов, вовлекаемых в регуляцию генетической активности на разных стадиях разных морфогенетических процессов. Такой взгляд на понимание механизмов domestikационных преобразований в объяснении отдельных моментов эволюционного процесса был высказан впервые Д.К. Беляевым еще в 1962 г. [19].

В анализе возможной генетической природы этих регуляторных изменений Д.К. Беляев отводил ключевую роль генам, контролирующим поведение. Гены, детерминирующие поведение, – это, как правило, гены с множественными регуляторными функциями, которые способствуют адаптации животных к человеку и к антропогенной среде в целом. Отбор, вовлекающий в сферу своего действия эти гены, Д.К. Беляев определял термином «дестабилизирующий». Такой отбор затрагивает нейроспецифические локусы с множественными регуляторными функциями. О преобладающей роли таких локусов в организменной эволюции в настоящее время дискутируется в литературе.

В настоящий момент наибольший прогресс в исследованиях молекулярных механизмов domestikации достигнут в исследованиях на разных породах собак. Секвенирован геном собаки, картировано более 3 тысяч микросателлитных маркеров, более 2 млн SNP (одиночных нуклеотидных замен). Охарактеризована их плотность и показано, что частота их возникновения у собак разных пород ниже, чем у волков. Актуальными остаются вопросы о том, какие гены лежат в основе ускоренной фенотипической эволюции собаки, какие изменения в этих генах наиболее существенны. Для генетического изучения морфологических особенностей собак были использованы некоторые гены-кандидаты. Например, гомеозисный ген *MSX2* экспрессируется у человека в ходе формирования мозгового и лицевого черепа. Мутации этого гена вызывают различные отклонения в его строении. Но секвенирование этого гена у собак 10 различных пород, отличающихся по форме черепа, выявило высокую консервативность этого гена. В то же время было показано, что одна из найденных замен другого гена (*TOOF1*), также вовлекаемого у человека в развитие черепа, достоверно связана с короткой и широкой формой головы у собак. Однако идентичность собаки и волка на уровне белкового сиквенса указывает на то, что мутации структурных генов не вносят большой вклад в эволюционные преобразования в ходе domestikации.

Хотя специфические гены, ответственные за увеличение темпа и размаха изменчивости, пока не идентифицированы, можно предполагать

наличие общей генетической основы, затрагивающей, как поведение, так и морфологию [30]. То, что это вполне может иметь место, хорошо демонстрируют результаты изучения генетики скелетной системы одомашниваемых серебристо-черных лисиц, параметры которой изменяются в процессе отбора по поведению [14].

Некоторые авторы, в попытках найти истоки высокой скорости морфологической эволюции, указывают на то, что источником новой вариации морфологических признаков может быть неклассическая генетическая вариация, например, вариация в числе тандемных повторов в генах. Как известно, тандемные повторы обильно представлены в кодирующих последовательностях генов, особенно вовлекаемых в регуляцию развития. Поскольку вариация в числе повторов может в 100 тысяч раз превышать скорость точковых мутаций, авторы выдвигают гипотезу, что вариация в протяженности тандемных повторов является главным и что функция повторов, связанных с генами развития, состоит в ускорении эволюции. Вероятнее всего, эта ускоренная эволюция некоторых нейроспецифических генов является отражением селекционного давления на эти гены. А это в свою очередь может служить иллюстрацией на уровне генов, творческой роли отбора как фактора, создающего изменчивость в направлении своего действия.

Следует особо подчеркнуть, что об этой функции отбора еще более 30 лет назад говорил Д.К. Беляев и подчеркивал необходимость более широких исследований творческой роли отбора [14].

С позиций концепции дестабилизирующего отбора Д.К. Беляеву удалось дать рациональное объяснение появлению в процессе одомашнивания громадного разнообразия форм домашней собаки в сравнении с мноморфностью ее дикого предка – волка. Ведь действительно, опираясь на эту концепцию можно допустить, что где-то в эоцене многие виды млекопитающих напоминали своим разнообразием нынешних собак: от сенбернара до гончей, от бульдога до таксы. Позднее такой уровень различий стал обычен для разных родов, а в наши дни он обычен для разных семейств. Если бы мы не знали долгой истории

существования людей и собак, то наверняка соединили бы всех собак в одно семейство, назвав таксу и бульдога разными родами – наравне с единым родом медведей.

Фенотипический параллелизм при одомашнивании разных таксономических групп животных

Одомашнивание разных исходных популяций, принадлежащих не только к одному и тому же виду, но даже к разным родам и семействам, а иногда даже к разным отрядам, приводит к сходной морфологической и физиологической трансформации. У всех без исключения животных, вовлеченных в сферу одомашнивания, в одном и том же направлении эволюционируют поведение, такие физиологические функции, как репродуктивная и гипофизарно-надпочечниковая. А также, как свидетельствует археологический и культурно-исторический материал, общие размеры тела и его пропорции. На самых ранних этапах одомашнивания у всех одомашниваемых животных возникают некоторые фенотипические изменения, которые называют морфологическими маркерами одомашнивания (рис. 1).

Причины удивительного явления – параллелизма в фенотипической изменчивости – все еще не до конца выяснены, механизмы этого процесса во многом загадочны. Его трудно объяснить случайными мутационными изменениями тождественных генов или стохастическими процессами. Нигде в биологии параллельная фенотипическая изменчивость не проявляется так ярко, как у домашних животных. Суть в том, что в ходе одомашнивания животных изменяются в основном одни и те же признаки, причем изменяются одинаково, хотя сами животные как нельзя более разнятся между собой, принадлежат не только к разным видам (американская норка и серебристо-черная лиса), но и к разным семействам (собачьи и куницы), и к разным отрядам (хищников, копытных, грызунов, зайцеобразных), даже к разным классам (млекопитающих и птиц). Закономерный характер морфофизиологической трансформации домашних животных, вероятнее всего, отражает закономерные изменения онтогенетических регуляторных систем.

Окрасочный параллелизм в ходе экспериментальной одомашнивания американской норки

Изучение окраски волосяного покрова, у различных организмов имеет в генетике достаточно длительную историю, но все еще не получает окончательного объяснения явление, которое называют фенотипическим параллелизмом в изменчивости и наблюдается который достаточно давно. Классическим примером проявления параллелизма в пигментации стала в своё время работа Дж.Б.С. Холдейна, где он показал, что изменчивость такого типа охватывает не только семейства и отряды, но и классы.

Поскольку в основе концепции дестабилизирующего отбора, предложенной академиком Д.К. Беляевым, лежат представления о роли

регуляторных систем развития, а они у представителей разных таксономических групп могут быть разными, на опытной звероферме Института цитологии и генетики СО РАН в экспериментальную одомашнивание была вовлечена американская норка (*Neovison vison*), принадлежащая к семейству *Mustelidae*. Был поставлен вопрос: будут ли у американской норки последствия дестабилизирующего отбора такими же, как и у лисиц, или они все же будут другими?

Первым ответом отбора американской норки, как и в аналогичном одомашнивании эксперименте с серебристо-черными лисицами, было изменение однородности исходной стандартной окраски мехового покрова в виде появления *de novo* качественного признака –

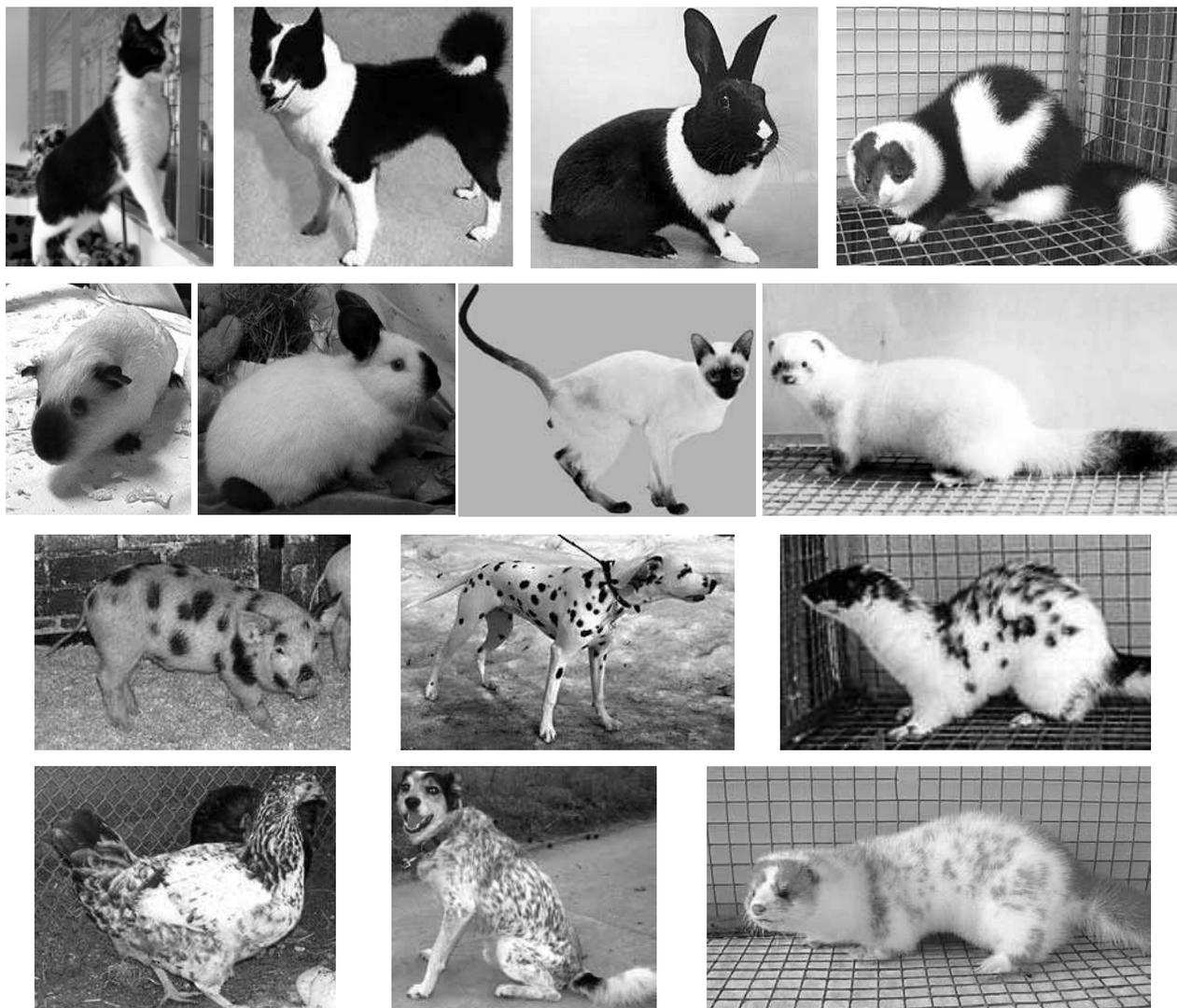


Рис. 1. Фенотипический параллелизм в изменчивости окраски при одомашнивании у разных видов, семейств, отрядов и классов [8]

обширной белой пятнистости или пегостей (рис. 1) [8]. Более того, в проявлении этого новшества наблюдается фенотипический параллелизм с другими исторически ранее одомашненными видами – кроликами, сиамскими кошками, морскими свинками.

Как интерпретировать такое фенотипическое сходство в окраске у представителей совершенно разных таксонов? На первый взгляд это зримое сходство побуждает апеллировать к закону гомологических рядов в наследственной изменчивости [31]. Именно такие качественные вариации Н.И. Вавилов считал наиболее показательными при рассмотрении параллелизма в наследственной изменчивости.

Исходя из прогностических возможностей в отношении параллельной изменчивости у разных таксонов, этот закон в свое время был воспринят как «таблица Менделеева в биологии» [8]. В самой формулировке Вавиловского закона заложена его предсказательная сила, позволяющая выявлять определенные типы и варианты изменчивости у тех видов, у которых они еще не проводились. И все же, несмотря на эвристически сильную сторону закона, он не объясняет причину и эволюционно-генетический смысл фенотипического сходства окрасочных aberrаций у разных видов, попавших в условия одомашнивания. Сразу же, вспоминается параграф «Конвергенция признаков» в дарвиновском «Происхождении...»: «Невероятно, чтобы потомки двух организмов, первоначально заметно между собой различавшихся, могли сблизиться в такой степени, которая привела бы к почти полной идентичности всей их организации». И далее в 5 главе, разбирая законы вариации, Дарвин продолжает: «Различные виды представляют аналогичные вариации, вследствие чего разновидность какого-либо вида нередко приобретает признак, свойственный родственному виду...» [32]. Раздумывая над фактами подобного рода, он проводил параллели между сходством в форме черепа у породы южноамериканского скота ньята, бульдога и мопсообразных пород собак. И все же, со времен Ч. Дарвина концепция гомологии хотя и составляет центральную часть эволюционной и сравнительной биологии, ее точное определение, несмотря на множество ее интерпретаций, крайне противоречиво. Более того, наличие

фенотипического параллелизма, казалось бы, противоречит дарвиновскому положению о неопределенной изменчивости, что и послужило в свое время основой для формирования номогенетического толкования эволюции. Достаточно вспомнить хорошо известное выражение автора эволюции на основе закономерностей географа Л.С. Берга о том, что «своими наблюдениями и опытами Вавилов проводит идею номогенеза более успешно, чем это делаю я в настоящей работе» [33].

Одним из последних крупных российских ученых, высказывавшихся против дарвиновской эволюции в поддержку точки зрения Берга был А.А. Любищев. Наиболее полное свое одобрение номогенеза он изложил в выпускаемых с конца 1960-х годов под редакцией Н.Н. Воронцова сборниках «Проблемы эволюции». В статье: «О постулатах современного селектогенеза» Любищев писал: «Живи Дарвин до настоящего времени и сохрани полную свежесть мысли и работоспособности, он был бы в лагере антидарвинистов» [34].

В качестве комментария к вышеизложенному может служить раннее обсуждение природы параллелизма в изменчивости организмов между выдающимися генетиками – Н.И. Вавиловым и Ю.А. Филипченко – стремлением первого к самым широким обобщениям и склонностью второго к углубленному анализу вопроса и собиранию научных фактов. В своей статье «О параллелизме в живой природе», посвященной анализу закона гомологических рядов в наследственной изменчивости Вавилова, Филипченко писал: «...можно ли признать все явления, описанные до сих пор под именем параллелизма в различных группах, за явления одного порядка, и нет ли тут на самом деле некоторого смешения различных вещей?» [35]. В четвертом издании своей книги «Изменчивость и методы ее изучения» Ю.А. Филипченко предлагает параллелизм, имеющий внешнее сходство, и зависящий в то же время от совершенно различных причин, разделить на три категории:

1. Генотипический параллелизм, основанный на наличии у близких видов одинаковых генов и сходных биотипов;

2. Экотипический параллелизм, основанный на появлении в виде ответа организма на внешние воздействия сходных экотипов, что

может зависеть у близких видов от одинаковых, у далеких – от совершенно различных генотипических структур;

3. Морфологический параллелизм, основанный на одинаковых возможностях развития наружных и внутренних макроскопических и микроскопических структур и наблюдающийся в более крупных систематических группах, к особенностям которых понятие о генах и генотипической структуре вообще не приложимо.

Далее он продолжает: «Поскольку Вавилов включил в закон гомологических рядов случаи генотипического параллелизма (число которых в настоящее время увеличилось во много раз), он действительно чрезвычайно удачно сформулировал то, что является весьма характерным для явлений групповой (*наследственной*) изменчивости. Однако в примерах, приводимых Вавиловым, фигурируют и явления (например, мимикрия), которые относятся не к генотипическому параллелизму, а к экотипическому, также характерному для групповой изменчивости» [35].

Н.И. Вавилов в окончательной редакции своего труда полностью принимает замечания Филипченко о необходимости различения фенотипической и генотипической изменчивости, введя соответствующий раздел (§ 4). Там он пишет: «Генетические исследования заставляют нас быть более осторожными и по внешнему виду не судить о неприменном сходстве генотипического порядка. Фенотипическое исследование есть первое приближение, за которым должно идти генетическое исследование» [36]. То есть, гомологичные признаки не обязательно имеют один и тот же генетический базис. Хотя этот недостаток не распространяется на гомологию генов, которые передаются вертикально, т.е. непрерывно в ряду поколений.

Н.И. Вавилов, ссылаясь на опыты А.Н. Луткова, получившего безлигульные рентгеномутанты ячменя указывал, что гомология, истинная на уровне фенотипа, на уровне генотипа может оказаться ложной: «Одинаковые изменения фенотипического порядка могут быть вызваны и разными генами». Особенно четко точка зрения Н.И. Вавилова выражена в его письме к Г.С. Зайцеву, опубликованном в 1977 г. в журнале «Природа»: «... признаки морфологические равно как физиологические могут и при внешней однородности быть разнородны генетически. ... Признак есть условная ступень в анализе формы» [37–39].

Здесь позиция Н.И. Вавилова очерчена совершенно недвусмысленно: о какой-либо регулярной параллельности изменений правомочно говорить, подразумевая генетическое единство дивергирующих форм. Эту оценку Вавилова необходимо вспомнить именно сейчас, когда современные приверженцы номогенетических толкований эволюции склонны рассматривать новейшие, действительно впечатляющие, достижения молекулярной эволюции как долгожданное «прямое» доказательство правоты номогенеза, вновь апеллируя к закону Вавилова. Но сложность механизмов, лежащих в основе параллелизмов изменчивости, продолжает приводить к неоднозначности в филогенетических построениях. Одним из наглядных примеров такой сложности могут быть современные работы по поискам и картированию главных генов количественных признаков, в которых достаточно часто обнаруживается, что одинаковое проявление одного и того же признака может быть обусловлено полиморфизмом разного набора главных («критических») для этого признака генов. Несмотря на развитие методов молекулярной генетики, до сих пор не удалось количественно описать параллельные замены на молекулярном уровне. В итоге, несмотря на почти вековую историю открытия закона Вавилова, и огромное количество подтверждающих его наблюдений, до сих пор остается на уровне описания феномена, механизмы которого неизвестны. Видимо не зря один из главных «архитекторов» синтетической теории эволюции, – сам Эрнст Майр, – расценивал «закон гомологических рядов в наследственной изменчивости» всего лишь как указание на *признак*, который можно использовать в таксономических изысканиях, *а не на упорядоченность и ограничения изменчивости* [40].

Возможно ли, начиная с Л.С. Берга, истолковывать феномен параллелизма в изменчивости без анализа его адаптивной ценности? Вряд ли, ведь проявление такой (кстати, как и любой другой) изменчивости, проходит оценку на адаптивность естественным отбором.

Д.К. Беляев параллелизм возникающей фенотипической изменчивости при одомашнивании разных видов животных объяснял воздействием на них одного и того же вектора отбора на domestikационное поведение [24, 25].

Как показывает рис. 1, исходя из сходства в фенотипической изменчивости, обусловленной единством процесса domestikации у видов достаточно далеких по происхождению, можно подразумевать наличие специфической генной компоненты, попадающей под давление одного и того же вектора отбора. Можно говорить, наряду со спецификой видов и родов, о наличии у них общих «генов domestikации», а точнее «генов стрессоустойчивости», обеспечивающих в условиях domestikации устойчивость и терпимость к психоэмоциональному стрессу, к пребыванию в условиях антропогенной среды промышленных звероферм.

Традиционно стрессовые воздействия в популяциях рассматривались и рассматриваются как факторы отбора, отмечающие недостаточно стрессоустойчивые генетические варианты в силу их пониженной жизнеспособности. В таком контексте стресс может приводить к механическому *уменьшению* генетической изменчивости в популяции, если в результате резкого падения численности она проходит через «бутылочное горлышко».

Однако эволюционно-генетической школой Д.К. Беляева показано, что стрессовые воздействия могут ускорять темп эволюционных и адаптационных преобразований путем *повышения* уровня изменчивости в популяциях [26].

Можно ли считать такой признак, как проявление белой пятнистости (пегостей) или той же сиамской раскраски мехового покрова в ходе domestikации самых разных таксономических групп животных, в том числе, и пушных зверей, нейтральным, не адаптивным? Вряд ли, – ведь он вполне может быть сцеплен в наследовании с адаптивным признаком – устойчивостью к психоэмоциональному стрессу, к проживанию в условиях неволи, к антропогенной среде, к успешному размножению изначально диких животных (внезапно оказавшихся по эволюционным меркам) в ограниченном и тесном жизненном пространстве клеточного содержания.

Конечно, внешнее сходство в раскраске волосяного покрова у совершенно отдаленных в таксономическом отношении видов, вовлеченных в процесс domestikации, не дает нам оснований судить о сходстве генотипического порядка. Но, исходя из поразительного сходства в фенотипической изменчивости, обу-

словленной единством процесса domestikации у видов достаточно далеких по происхождению, можно подразумевать наличие специфической генной компоненты, попадающей под давление одного и того же вектора отбора (рис. 1).

Мы можем говорить наряду со спецификой видов и родов о присутствии у них «генов domestikации» или «генов стрессоустойчивости», замаркированных сходными окрасками. У разных видов, втягиваемых в один и тот же канал отбора, а конкретно – на способность выдерживать проживание в стрессирующих условиях неволи, – в ряду поколений в одном и том же направлении реорганизуются гормональные регуляционные механизмы, нейрохимические механизмы головного мозга, возникают одни и те же морфологические и физиологические изменения. То есть, речь идет о наследственно детерминированной, канализируемой изменчивости фенотипов – изменчивости в определенном направлении, так, как понимал это Н.И. Вавилов.

И как одно из следствий такого отбора на одомашнивание, у пушных зверей, можно предсказать появление таких же окрасок меха, как и у животных, одомашненных исторически в более ранние сроки, подобно тому, как периодическая система Менделеева дает возможность предсказывать существование до поры до времени неизвестных элементов.

Развитие Д.К. Беляевым представлений о роли поведения и стресса в механизмах одомашнивания диких животных, явилось новой парадигмой в изучении процесса domestikации и эволюции. Проблема была ориентирована на выявление тех процессов, которыми реализуется действие отбора по поведению; на интеграцию теории искусственного отбора с современными представлениями о функциях мозга.

Разные науки обретали свои парадигмы в разное время. Парадигма, пишет американский историк науки, один из виднейших фигур среди философов науки XX столетия Томас Кун в своей книге «*Структура научных революций*» (1975 г.), может рассматриваться как новая система взглядов в определенной области научного знания, как некое «образцовое достижение про-

шлого». По мнению Куна, основная ценность парадигмы состоит в том, что она объединяет в единое целое все схемы, существующие в рамках дисциплины, и дает исследователям уверенность в социальной оправданности их дорогостоящих и кропотливых исследований. Но в какой-то момент возникает теория, объясняющая некую проблему в данной области знаний лучше, чем другая теория, существующая в данной области знаний и конкурирующая с первой. Такая теория начинает привлекать внимание большинства исследователей последующих поколений, и в результате старые конкурирующие школы прекращают свое существование. По аналогии с естественным отбором в природе парадигмы в науке выживают потому, что вымирают их конкуренты. И если среди конкурирующих теорий выделяется одна, а предлагаемые ею новые объяснения явлений получают признание у последующих поколений исследователей, можно считать, что родилась новая парадигма.

Согласно парадигмальной концепции развития науки, переход от одной парадигмы к другой имеет характер *научной революции*. Пример этого – переход от классической филогенетики к кладистике.

История науки, пишет Кун, есть смена последовательных парадигм (подобно тому, как в истории общества один социальный строй сменяется другим), каждая из которых сильно переориентирует интересы ученых внутри определенной области знаний. К примеру, сто лет назад ученые были также убеждены в том, что картезианско-ньютоновская механическая парадигма объясняет устройство Вселенной, как в наше время убеждены, что устройство Вселенной объясняется теорией относительности Эйнштейна. Иными словами, физик XIX столетия был не менее уверен в правильности своего понимания физических явлений, чем современный физик, знакомый с теорией относительности. Но, тем не менее, величие обеих концепций вызывает восхищение [41].

Список использованных источников

1. Богданов, Е.А. Происхождение домашних животных / Е.А. Богданов. – М.: Книгоиздательство МСХИ, 1914. – 406 с.
2. Богданов, Е.А. Происхождение домашних животных / Е.А. Богданов. – М.: 1937, Сельхозгиз. – 406 с.
3. Price, E.O. Behavioural aspects of animal domestication / E.O. Price // *Qurt. Rev. Biol.* – 1984. Vol. 59, № 1. – P. 1–32.
4. Trut, L.N. Early Canid Domestication: The Farm-Fox Experiment / L.N. Trut // *American Scientist.* – 1999. – Vol. 87. – P. 160–169.
5. Trut, L.N. Experimental studies of Early Canid Domestication. Chapter 2. The Genetics of the Dog / L.N. Trut. – CABI Publishing, 2001. – P. 15–42.
6. Zeder, M.A. Documenting domestication: the intersection of genetics and archaeology / M.A. Zeder // *Trends in Genetics.* – 2006. – Vol. 22. № 3. – P. 139–155.
7. Трапезов, О.В. Об одомашнивании пушных зверей (к 140-летию выхода в России труда Ч. Дарвина «Прирученные животные и возделанные растения») / О.В. Трапезов // *Информ. Вестник ВОГиС.* – 2007 г. – Т. 11. № 1. – С. 45–61.
8. Трапезов, О.В. Гомологические ряды в наследственной изменчивости окраски меха в ходе domestikации пушных зверей / О.В. Трапезов // *Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 75-летию создания научно-исследовательского института пушного звероводства, 8 июня 2007 г. – Москва, 2007 б.* – С. 137–139.
9. Трапезов, О.В. Домestikация животных и растений / О.В. Трапезов // *Международная Научно-методическая конференция, посвященная 90-летию академика Д.К. Беляева. «Актуальные проблемы и перспективы развития агропромышленного комплекса». 1–2 марта 2007. Том II. Проблемы агротехнологии, ветеринарной медицины и биотехнологии в животноводстве. – Иваново, 2007в.* – С. 11–14.
10. Трапезов, О.В. Домestikация американской норки (*Mustela vison* Schreber, 1777) / О.В. Трапезов // *Материалы конференции «Современные проблемы биологической эволюции». К 100-летию Государственного Дарвиновского музея 17–20 сентября 2007, г. Москва. – М.: Изд-во ГДМ, 2007. – С. 152–153.*
11. Трапезов, О.В. Домestikация как одно из самых ранних интеллектуальных достижений человечества (к 140-летию выхода на русском языке произведения Чарльза Дарвина «Прирученные животные

- и возделанные растения») / О.В. Трапезов // *Философия науки*. – 2007д. – № 4 (35). – С. 104–129.
12. Трапезов, О.В. Дарвинизм и уроки практической селекции в России / О.В. Трапезов // *Информ. Вестник ВОГиС*. – 2009 а. – Т. 13. № 2. – С. 249–297.
13. Трапезов, О.В. Эффекты дестабилизирующего отбора. Американская норка (*Mustela vison* Schreber, 1777) как модель / О.В. Трапезов // *Чарльз Дарвин и современная наука. Сборник тезисов международных научных конференций Чарльз Дарвин и современная биология 21–23 сентября 2009 г., Санкт-Петербург и Теория эволюции: между наукой и идеологией. Историко-научные и философско-методологические проблемы эволюционизма 23–25 сентября 2009 г., Санкт-Петербург*. – 2009 б. – С. 74–75.
14. Трут, Л.Н. Доместикация животных в историческом процессе и в эксперименте / Л.Н. Трут // *Информационный Вестник ВОГиС*. – 2007. – Т. 11. № 2. – С. 273–289.
15. Vila, C. Genes of domestic mammals augmented by backcrossing with wild ancestors / C. Vila, J. Seddon, H. Ellegren // *Trends Genet.* – 2005. – Vol. 21. – P. 214–218.
16. Афанасьев, В.А. Изменения пушных зверей под влиянием одомашнивания (Управление звероводством Министерства сельского хозяйства СССР) / В.А. Афанасьев // *Совещание, посвященное 100-летию выхода в свет книги Чарльза Дарвина «Изменение животных и растений под влиянием одомашнивания» (1968), 18–20 декабря 1968 г.: Тез. докл.* – М.: Изд-во Моск. гос. ун-та, 1968. – С. 23–28.
17. Афанасьев, В.А. Изменение пушных зверей при разведении в клетках / В.А. Афанасьев // *Проблемы domestикации животных и растений*. – М.: Наука, 1972. – С. 33–37.
18. Keeler, C.E. The association of the black (non-agouty) gene with behavior in the Norway rat / C.E. Keeler // *J. Hered.* – 1942. – Vol. 33. – P. 371–384.
19. Беляев, Д.К. О некоторых проблемах коррелятивной изменчивости и их значении для теории эволюции и селекции животных / Д.К. Беляев // *Изв. СО АН СССР*. – 1962. – № 10. – С. 111–124.
20. Беляев, Д.К. Дестабилизирующий отбор / Д.К. Беляев // *Развитие эволюционной теории в СССР (1917–1970 годы)*; ред. С.Р. Микулинский, Ю.И. Полянский. – Л.: Наука. Ленингр. отд-ние, 1983. – С. 266–277.
21. Беляев, Д.К. От естественного отбора к искусственному: чудеса селекции / Д.К. Беляев, Л.Н. Трут // *Наука в СССР*. – 1982. – № 5. – С. 24–29, 60–64.
22. Шмальгаузен, И.И. Факторы эволюции. Теория стабилизирующего отбора. / И.И. Шмальгаузен. – Наука, 1968. – С. 1–451.
23. Дарвин, Ч. Изменения домашних животных и культурных растений. / Ч. Дарвин. – Т. 4. – М.; Л.: АН СССР, 1951. – 883 с.
24. Беляев, Д.К. Генетические аспекты domestикации животных. Проблемы domestикации животных и растений / Д.К. Беляев. – М.: Наука, 1972. – С. 39–45.
25. Беляев, Д.К. Дестабилизирующий отбор как фактор изменчивости при domestикации / Д.К. Беляев // *Природа*. – 1979. – № 2. – С. 36–45.
26. Belyaev, D.K., Borodin P.M. The influence of stress on variation and its role in evolution / D.K. Belyaev, P.M. Borodin // *Biol. Zentralbl.* – 1982. – Vol. 100. – P. 705–714.
27. Levine, M. Of minds and embryos: Left-right asymmetry and the serotonergic controls of pre-neural morphogenesis / M. Levine, G.A. Buznikov, J.M. Lauder // *Dev. Neurosci.* – 2006. – Vol. 28. № 3. – P. 171–185.
28. Popova, N.K. From genes to aggressive behavior: the role of serotonergic system / N.K. Popova // *BioEssays*. – 2006. – Vol. 28. № 5. – P. 495–503.
29. Дарвин, Ч. Происхождение человека и половой подбор / Ч. Дарвин // *Полн. собр. соч. Т. II. Кн. 1*; под ред. М.А. Мензбир. – М.; Л.: Гос. изд-во, 1927. – 623 с.
30. Genetic analysis of the canid skeleton: morphological loci in the portuguese water dog population / K.G. Lark // *The Dog and its Genome*; eds E.A. Ostrander, U. Giger, K. Lindblad-Toh. – N.Y.: Cold Spring Harbor, 2006. – P. 67–80.
31. Vavilov, N.I. The law of homologous series in variation / N.I. Vavilov // *J. of Genetics*. – 1922. – Vol. 12. № 1. – P. 47–89.
32. Дарвин, Ч. Происхождение видов путем естественного отбора или сохранение благоприятствуемых пород в борьбе за жизнь: пер. с шестого издания (Лондон, 1872) / Ч. Дарвин; отв. ред. А.Л. Тахтаджян. – СПб: Наука, 1991. – 539 с.

33. Берг, Л.С. Труды по теории эволюции –1922–1930 / Л.С. Берг. – Л.: 1977. – 387 с.
34. Любищев А.А. О постулатах современного селектогенеза. В кн.: Проблемы эволюции / А.А. Любищев; ред. Н.Н. Воронцов. – Новосибирск: Наука. – 1973а. – Т. III. – С. 31–57.
35. Филипченко, Ю.А. Изменчивость и методы ее изучения / Ю.А. Филипченко. – М.: Л., 1929. – С. 202.
36. Вавилов Н.И. Предисловие в кн.: Мендель И.Г. Опыты над растительными гибридами / Н.И. Вавилов. – М.:Л.: ОГИЗ Сельхозгиз, 1935.
37. Вавилов, Н.И. Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости. Избр. произведения: В 2 т. / Н.И. Вавилов. – Л.: Наука, 1967а. – Т. 1. – С. 7–61.
38. Вавилов, Н.И. Научные основы селекции пшеницы. Избр. произведения: В 2 т. / Н.И. Вавилов. – Л.: Наука, 1967б. – Т. 2. – С. 7–259.
39. Вавилов, Н.И. Письма Г.С. Зайцеву / Н.И. Вавилов // Природа. – 1977.– № 4. – С. 102–115.
40. Mayr, E. Systematics and the Origin of Species / E. Mayr. – N.Y., Columbia Univ. Press, 1942. – P. 120. (Русск. издание – Э. Майр. Систематика и происхождение видов, М.: Иностран. лит-ра, 1947).
41. Кун, Т. Структура научных революций / Т. Кун. – М.: Прогресс, 1975. – С. 216.

Дата поступления статьи 29 сентября 2014 г.

ТРАНСГЕНЕЗ КАК ЭФФЕКТИВНЫЙ СПОСОБ МОДИФИКАЦИИ ГЕНОМОВ ЖИВОТНЫХ

Обзорная статья

Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук
Российская Федерация, 630090, г. Новосибирск, пр-т ак. Лаврентьева, 10

Клетки животных и растений постоянно контактируют с чужеродной ДНК эукариот других видов при питании и прокариотической ДНК бактерий, грибов, вирусов при инфекции. Как правило, цитоплазма клетки «справляется» с этим потоком чужеродной ДНК, поступающей с продуктами питания или при инфекции, расщепляя ее до нуклеотидов в специализированных структурах, таких как лизосомы. В результате чужеродная ДНК не доходит до ядра клеток и, следовательно, лишена возможности «включиться» в ее геном. Исключением являются ретровирусы, способные проникать через клеточные мембраны и достигать ядра клетки и даже встраиваться в ее геном, становясь его облигатным наследуемым компонентом [13, 14]. Это результат длительной эволюции взаимоотношений геномов вирусов и клеток животных и растений, в ходе которой выработался специальный механизм, позволяющий чужеродной ДНК встраиваться в геном клеток-мишеней, вызывая его генетическую модификацию.

Немногим более 30 лет назад, исследователи разработали способ переноса генов чужеродной ДНК от одного вида животных к другому [2, 4]. Учитывая решающую роль цитоплазмы в «охране» генома от чужеродной ДНК, авторы разработали метод прямой микроинъекции

рекомбинантной ДНК в мужской пронуклеус (на стадии P3-P4 по [1]) (рис. 1) зигот мыши. Пронуклеус – аналог ядра – практически не содержит ферментов, деградирующих ДНК, поэтому инъецированная ДНК может сохраняться по крайней мере в течение одного клеточного цикла, но в реальности сохраняется даже после 3–5 делений.

Сама процедура инъекции в пронуклеус осуществляется под микроскопом с помощью микроманипулятора (рис. 2). Считается оптимальной инъекция пронуклеус 2000–4000 копий рекомбинантной ДНК в объеме 1–2 пкл [5]. После такой микроинъекции пронуклеус увеличивается в объеме, что является свидетельством успешности процедуры. Поскольку процедура травматична, экспериментальные зиготы после инъекции кратковременно культивируют (от 2-х до 4-х часов), визуально идентифицируются и удаляются поврежденные зиготы [5]. Неповрежденные экспериментальные зиготы трансплантируют хирургическим путем в воронку матки суперовулированных (псевдобеременных) самок (рис. 3). Несмотря на сложность процедуры микроинъекции ДНК в зиготы, квалифицированный оператор способен инъецировать 50–70 зигот за один опыт и затем трансплантировать приемным матерям.

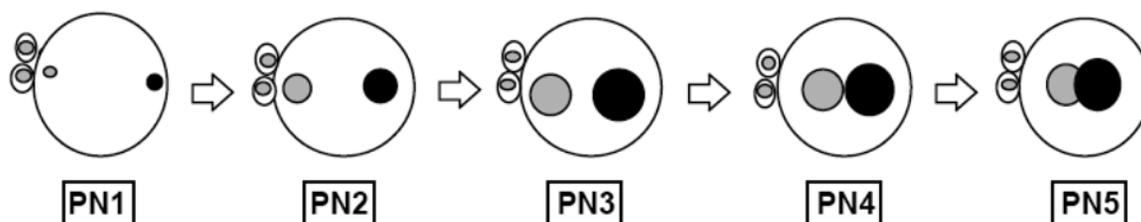


Рис. 1 Схема развития одноклеточного эмбриона мыши по [1]. Хроматин мужского (отцовский) и женского (материнский) пронуклеусов представлены черным и серым цветами, соответственно. PN1 – небольшие пронуклеусы расположены по периферии эмбриона; PN2 – пронуклеусы увеличиваются в размерах и начинают двигаться в центре эмбриона; PN3 – пронуклеусы продолжают увеличиваться в размерах и сближаться; PN4 – большие пронуклеусы находятся рядом в центре эмбриона; PN5 – пронуклеусы сливаются и одновременно вступают в митоз

Сложнее дело обстоит с зиготами большинства сельскохозяйственных животных: коров, овец, коз, пушных зверей и т.д. Цитоплазма зигот этих животных содержит липидные гранулы и включения и поэтому практически не прозрачна. С целью визуализации пронуклеусов исследователи используют кратковременное центрифугирование, в результате чего происходит визуализация пронуклеусов.

Судьба инъектированной ДНК в зиготах складывается различным образом. В небольшом объеме ядра введенная ДНК присутствует в высокой концентрации, что приводит к образованию конкатенатов, то есть комплексов из нескольких молекул рекомбинантной ДНК, связанных нековалентными связями. Как отмечалось выше, введение рекомбинантной ДНК осуществляется на стадии P3–P4 (рис. 1), то есть в тот период, когда идет активная репликация ДНК в пронуклеусах реципиентного эмбриона. Именно в момент репликации, образования репликационных вилок, создаются условия физического контакта хромосомной и экзогенной ДНК через образование нековалентных связей благодаря частичной комплементарности. Следствием такого контакта является «вовлечение» экзогенной ДНК в репликацию хромосомной ДНК и встраивания, интеграции чужеродной ДНК в хромосому реципиентного генома. Интегрированную чужеродную ДНК в реципиентном геноме принято называть **трансген**, так как она становится компонентом генома и, следовательно, способна наследоваться в последующих клеточных поколениях. Важно подчеркнуть, что, как правило, интеграция происходит случайным образом и только в одно место реципиентного генома. Наглядным примером может служить рис. 4, показывающий локализацию трансгена у 4-х трансгенных животных.

Важно отметить, что зачастую интеграция осуществляется в нескольких копиях, благодаря образовавшимся конкатенатам до интеграции, о чем упоминалось выше. Например, при анализе числа копий двух трансгенов у восьми трансгенных мышей, было установлено, что у трех из четырех исследованных было 2–4 копии, а у одного достигало 200 копий из расчета на гаплоидный геном, а в другой группе 7 из восьми исследованных трансгенных животных имели 1–3 копии, а один – 48 копий трансгена (Burkov et al. 2013).

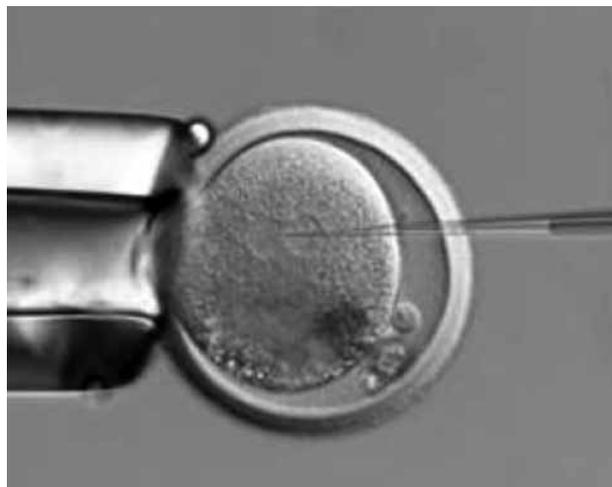


Рис. 2. Момент введения микропипетки с раствором ДНК (справа) в пронуклеус зиготы козы, удерживаемой пипеткой-присоской. Справа в зиготе, хорошо виден мужской пронуклеус (показан стрелкой), а слева женский. x 300 [8]

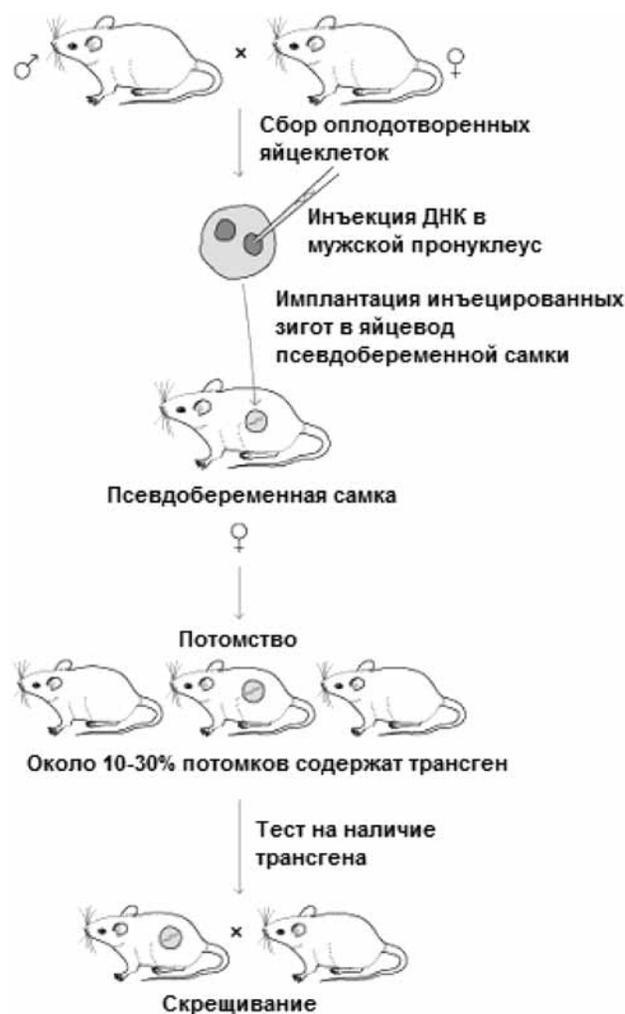


Рис. 3. Схема получения трансгенных животных путем инъекции чужеродной ДНК в зиготы [5]

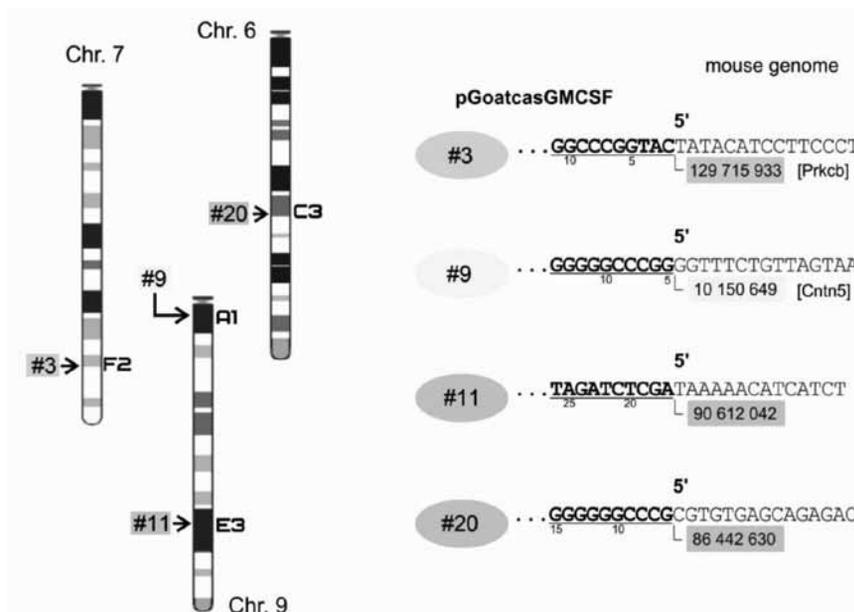


Рис. 4. Хромосомная локализация трансгена pGoatcasGMCSF у 4-х трансгенных мышей #3, #9, #11 и #20, ставших основателями линий (Burkov et al. 2013). Видно, что у трансгенных #3 и #20 мышей интеграция трансгена произошла в хромосомы 6 (Chr. 6) и 7 (Chr. 7), а у двух других интеграция прошла в хромосому 9 (Chr. 9), но в разные ее районы. Справа представлены последовательности ДНК (выделены серым цветом) в местах инсерций трансгена (выделены черным цветом) на физической карте мыши

Идентификация трансгенных животных среди родившихся особей из инъекированных зигот проводится с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) по присутствию фрагментов ДНК ожидаемого размера. Поскольку, как правило, последовательности ДНК трансгенов не имеют гомологичных последовательностей в геноме реципиента, то трансгенных животных можно надежно идентифицировать подбором праймеров. В качестве примера на рис. 5 показаны результаты идентификации трансгенных мышей, несущих конструкцию с геном *hG-CSF* человека.

Выше рассматривалась ситуация когда чужеродная ДНК интегрируется на одноклеточной

стадии. Однако если интеграция чужеродной ДНК не произошла на одноклеточной стадии, она может осуществиться на более поздней стадии, например, на двух- или четырехклеточной стадии. В этом случае развивающийся эмбрион будет мозаиком, состоящим из двух типов клеток: те, которые содержат трансген, и клеток, в которых он отсутствует, поскольку они являются потомками трансгенных и нетрансгенных бластомеров.

Другим важным последствием мозаицизма является, то, что и гаметы трансгенного животного будут представлены также двумя типами – с трансгеном и без трансгена. В ре-

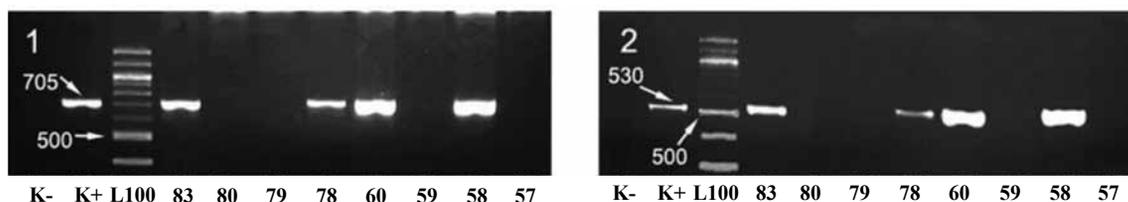


Рис. 5. Идентификация трансгенных животных с помощью ПЦР с использованием праймеров, комплементарных к 5'- последовательности промотора трансгена и последовательности внутри гена *hG-CSF* (кодирует гранулоцит-колониестимулирующий фактор человека) (слева) и к правой части гена *hG-CSF* и 3'- нетранслируемой области трансгена (справа) [12]. Видно, что среди восьми исследованных животных, четыре (#83, #78, #60 и #58) позитивны по присутствию фрагментов ДНК ожидаемого размера, 705 п.о. (слева) и 530 п.о. (справа), соответственно. Позитивный контроль (K+) – рекомбинантная ДНК трансгена; негативный контроль (K-) – отсутствует ДНК; L100 – фрагменты маркерной ДНК разного молекулярного веса с шагом 100 п.о.

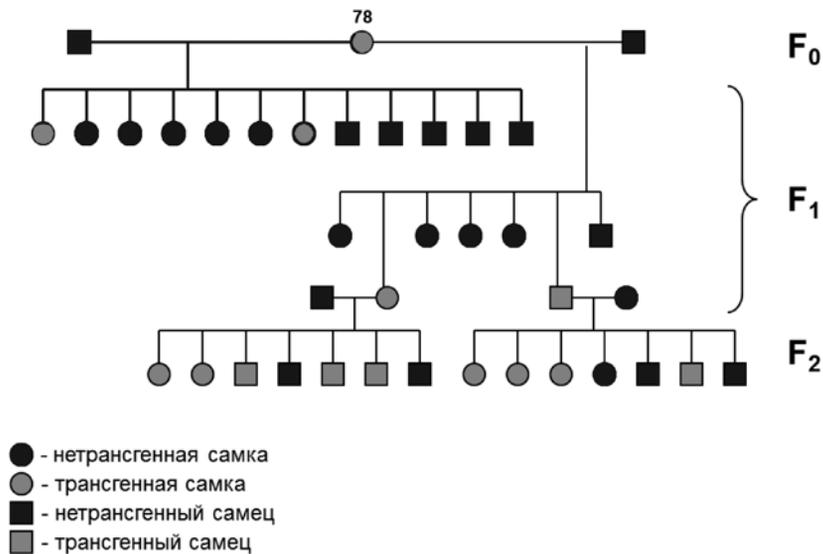


Рис. 6. Мозаичный тип наследование трансгена в потомстве F_1 трансгенной самки #78 от скрещивания его с 2-мя нетрансгенными самками. Серый и черный цвета обозначают трансгенных и нетрансгенных потомков соответственно. Наблюдается значительное отклонение от ожидаемого 1:1 у потомков F_1 , однако в последующих поколениях имеет место менделевское расщепление, близкое к 1:1

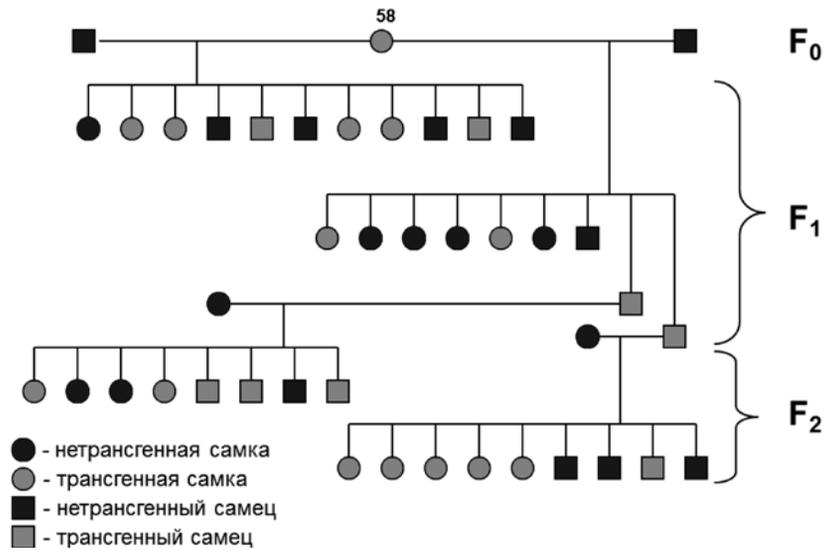


Рис. 7. Менделевское наследование трансгена в F_1 и F_2 трансгенной самки #58 от скрещивания с нетрансгенными животными. Обозначения те же, что и в рис. 6

зультате этого мозаицизма гамет, в потомстве F_1 таких трансгенных животных от скрещивания с нетрансгенными животными будет наблюдаться отклонение от менделевского расщепления 1:1 (рис. 6) в пользу увеличения числа нетрансгенных потомков. Рис. 6 и 7 иллюстрируют мозаичное и менделевское наследование трансгенов у двух трансгенных животных. Частота мозаицизма варьирует от 10 до 20% среди трансгенных животных так называемого поколения F_0 , то есть родившихся и развившихся из инъекцированных зигот.

Как отмечалось выше, интеграция трансгена происходит случайным образом, то есть трансген попадает в разное хромосомное окружение, контекст. Следствием этого является достаточно выраженная вариабельность в экспрессии трансгена у разных трансгенных животных от полного отсутствия экспрессии до уровня, сопоставимого с таковым аутентичного гена. В работах первых десятилетий такая вариабельность объяснялась именно влиянием хромосомного окружения трансгена. По мере накопления знаний о регуляции генов стало очевидно, что

первоначальное упрощенное представление о достаточности так называемого «минимального» промотора для обеспечения надежной экспрессии трансгена экстраполировалось избыточно широко. Поводом послужило исследование трансгенных мышей, несущих конструкцию, включающую ген гормона роста человека, «слитого» с промотором гена эластазы крыс размером 213 п.о. [10]. Ornitz et al. [10] наблюдали экспрессию гена гормона роста человека только в ацинарных клетках поджелудочной железы, то есть в клетках, в которых активен ген эластазы. Однако, большинство генов, особенно характеризующиеся ткане-специфичной или стадия-специфичной экспрессией, регулируются многими транскрипционными факторами, сайты которых могут располагаться на протяженных 5'-фланговых последовательностях промоторов, нередко превышающих 10 и более

тыс. п.о. С учетом этого, при создании конструкций неизменным условием является сохранение ключевых регуляторных элементов в промоторах, контролирующих экспрессию гена «интереса» (любой ген, кодирующий белок, либо малоизученный относительно функции, или представляющий интерес в прикладном аспекте). В качестве примера можно рассмотреть создание конструкции, в которой 5'-фланговый район гена альфа-S₁-казеина козы был «слит» с полноразмерным геном *G-CSF* (кодирует гранулоцит-колониестимулирующий фактор) человека и 3'-нетранслируемым районом гена альфа-S₁-казеина коровы ([12]; рис. 8). Присутствие 3409 п.о. фрагмента промотора альфа-S₁-казеина козы в конструкции достаточно для корректной экспрессии гена *G-CSF* человека у трансгенных мышей в молочной железе и только в период лактации (рис. 9).

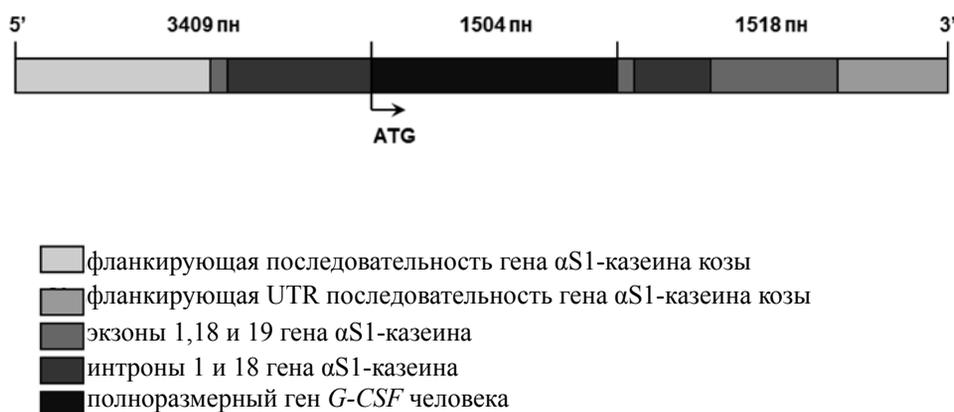


Рис. 8. Схема организации трансгена, содержащего 5'-фланкирующую последовательность вместе с промотором гена альфа-S₁-казеина козы размером 3409 п.о., ген *G-CSF* человека и 3'-фланкирующую последовательность гена альфа-S₁-казеина коровы [12]

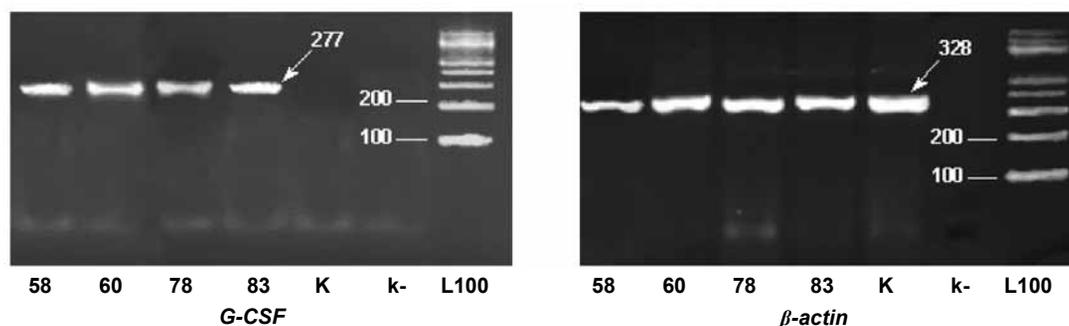


Рис. 9. Анализ транскриптов гена *G-CSF* человека (слева) и гена β -actin (справа) в молочной железе у лактирующих трансгенных самок мышей: #58, #60, #78 и #83 и нетрансгенной самки (K) (Serova et al. 2011). Видно, что транскрипт гена *G-CSF* человека ожидаемого размера (277 п.о.) присутствует у трансгенных самок, отсутствует у нетрансгенной, тогда как транскрипт (328 п.о.) гена β -actin (активен во всех клетках) определяется у всех анализируемых самок. K – отрицательный контроль ОТ-ПЦР (не добавлена мРНК); L100 – маркер молекулярных весов

Тем не менее, до сих пор не существует способов предотвращения эктопической экспрессии трансгенов, то есть предсказуемый профиль экспрессии трансгена по органам и тканям, может в реальности наблюдаться в тканях и клетках, в которых используемый промотор в норме неактивен. Большинство исследователей полагает, что причиной эктопической экспрессии является то, что в конструкции трансгена не представлены регуляторные последовательности, в норме расположенные за десятки тысяч пар оснований от самого гена. Действительно, такие отдаленные системы регуляции показаны для ряда генов, хотя для большинства генов это нехарактерно.

Для того чтобы преодолеть эктопическую экспрессию трансгенов было предложено использовать большие фрагменты геномной ДНК (размером от 100 до 500 тысяч пар оснований), включающей ген интереса. С этой целью предлагается использовать вектора на основе ВАС клонов или искусственных хромосом (YAC клоны). Однако, как показали более поздние исследования, при инъекции гигантских молекул геномной ДНК имеет место их физическая «поломка» или перестройки при интеграции в хромосому реципиентного генома [3, 7].

На протяжении более 30 лет с момента разработки технологии трансгенеза животных, этот подход эффективно и активно используется как в фундаментальных, так и прикладных исследованиях. Наиболее популярным методом анализа функции гена является маркировка его экспрессии в клетках в ходе развития трансгенных животных. Стратегия такого подхода основана на создании конструкций, в которых промотор разного размера анализируемого гена «слит» с геном-репортером, например, *lacZ* (кодирует бета-галактозидазу *E.coli*) (рис. 10) или *GFP* (кодирует «зеленый флуоресцентный белок» green fluorescent protein) (рис. 12).

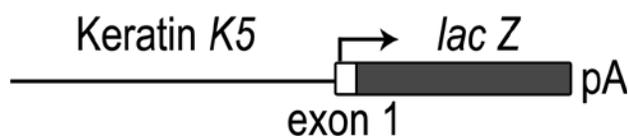


Рис. 10. Структура трансгена *K5Z*, в которой промотор гена кератина коровы размером 5300 п.о. «слит» с геном-репортером *lacZ* *E.coli* вместе с сигнальной последовательностью полиаденилирования SV40 (pA) [11]

Будучи введенным в геном животных, такой трансген позволяет визуализировать клетки, в которых активен анализируемый ген, путем гистохимического окрашивания клеток на активность бета-галактозидазы (в геноме млекопитающих такого фермента нет) (рис. 11).

Другой пример с использованием *GFP*, позволяющий визуализировать клетки позитивные по экспрессии трансгена – рис. 12, на котором показана конструкция, несущая ген *GFP* под контролем промотора бета-актинового гена, активного в клетках любого типа.

Трансгенные мыши, несущие такой трансген в своем геноме, содержат клетки, меченые зеленым флуоресцентным белком.

Визуализация экспрессии трансгена позволяет оценивать функцию промоторов, используя в конструкциях разные их размеры и наблюдая экспрессию гена-репортера у трансгенных животных. Такая стратегия позволила выявить функциональные регуляторные сайты у многих генов, имеющих клеточно- или тканеспецифическую экспрессию.

Разработанные экспериментальные подходы по получению трансгенных животных неизбежно привели к использованию таких животных в прикладных целях, в качестве «биореакторов»-производителей биологически ценных белков человека. Наиболее популярными и продвинутыми технологиями являются получение трансгенных животных (козы, овцы, коровы и т.д.), в геном которых введены конструкции, находящиеся под контролем промоторов «молочных генов», как это показано на рис. 8. «Молочные гены» – это группа генов, которые экспрессируются исключительно в эпителиальных клетках молочной железы, причем особенно активно в период лактации. Белки молока млекопитающих представлены главным образом альфа-S₁-, S₂-, бета- и каппа-казеинами (более 70% всех белков молока), а также лактальбуминами и лактаглобулинами. У грызунов активен в молочной железе еще один ген, acid whey, кодирующий кислый белок. В качестве примера можно рассмотреть конструкцию, представленную на рис. 8, в которой 5'-фланкирующая последовательность, включающая промотор, гена альфа-S₁-казеина козы, «слита» с полноразмерным геном *G-CSF* человека и 3'-фланкирующей последовательностью

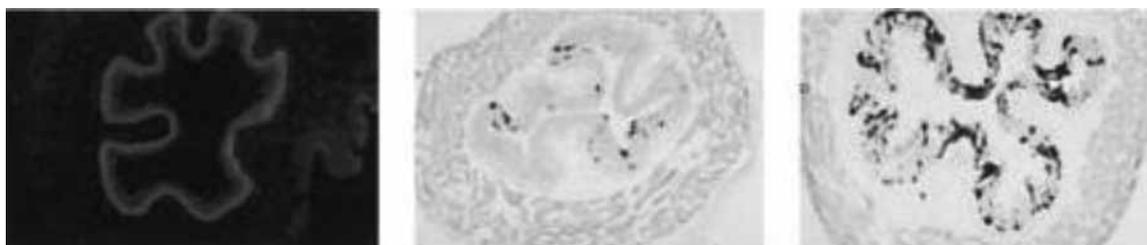


Рис. 11. Сравнение экспрессии эндогенного гена *keratin 5* в клетках пищевода (крайний слева, окраска с мечеными антителами против кератина 5) и трансгена *K5Z* в двух трансгенных линиях мышей в клетках пищевода (в середине и крайний справа, гистохимическая окраска на бета-галактозидазу *E. coli*). Видно, что у одного трансгенного животного экспрессия трансгена *K5Z* (крайний справа) напоминает таковую эндогенного гена, тогда как у другого только часть клеток эпителия пищевода экспрессирует трансген *K5Z* (в центре), то есть имеет место мозаичный тип экспрессии [11]

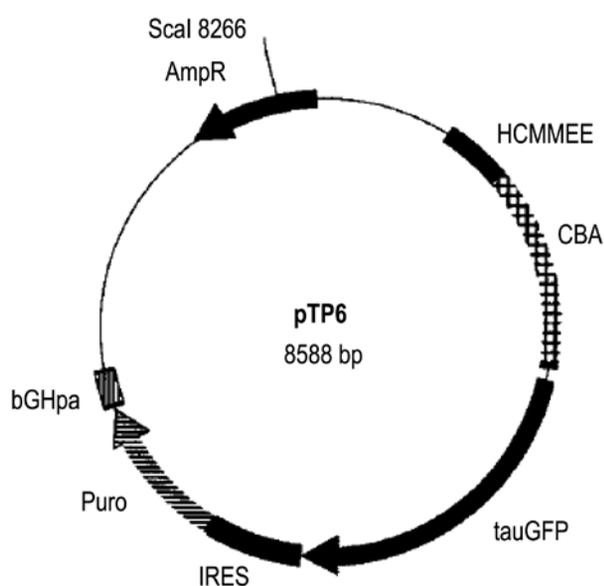


Рис. 12. Конструкция *tauGFP* с геном-репортером «зеленый белок» (*tauGFP*) под контролем промотора бета-актинового гена курицы (*CBA*) и селективируемым геном устойчивости к пурамицину (*Puro*)

гена альфа- S_1 -казеина коровы. При создании этой конструкции предусматривалось, что при введении ее в геном мышей или коз, она будет обеспечивать экспрессию гена *G-CSF* человека в молочной железе трансгенных животных. Анализ экспрессии гена *G-CSF* человека у трансгенных мышей показал присутствие транскриптов этого гена только в молочной железе (рис. 9). Более того, иммунофлуоресцентный анализ с использованием меченых антител против гранулоцит-колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) человека показал, что только в эпителиальных клетках молочной железы присутствует этот белок.

Независимый Вестерн-блот анализ Г-КСФ в молоке трансгенных мышей показал присутствие белка, причем в двух формах – гликозилированной и негликозилированной (рис. 13). Важно отметить, что гликозилированная форма Г-КСФ человека функционально соответствует той форме, которая синтезируется в норме у человека, тогда как негликозилированная менее активна.

Важно отметить, что секретируемый белок Г-КСФ человека в молоке трансгенных мышей (рис. 14) обладает функциональными свойствами, сопоставимыми с нативным Г-КСФ человека.

На рис. 15 показаны результаты колониобразующей способности образцов молока стимулировать пролиферацию клеток-предшественников гранулоцитарного ряда на примере пуповинной крови человека. Видно, что колонии содержат клетки гранулоцитарного ряда на разных стадиях дифференцировки. Клетки пуповинной крови обработаны молоком трансгенной самки мыши разведенной в 30 000 раз.

Резюмируя результаты, полученные на трансгенных мышях, несущих ген *G-CSF* человека под контролем регуляторной последовательности гена, следует добавить, что продукция белка Г-КСФ человека достигала 1 мг в миллилитре молока. Из этого следует, что молоко с таким содержанием целевого белка может служить источником для его очистки. Вполне понятно, что мыши для этой цели не подходят. Однако полученные данные о параметрах экспрессии данной конструкции привлекательны и могут быть использованы для получения трансгенных коз как продуцентов Г-КСФ человека.

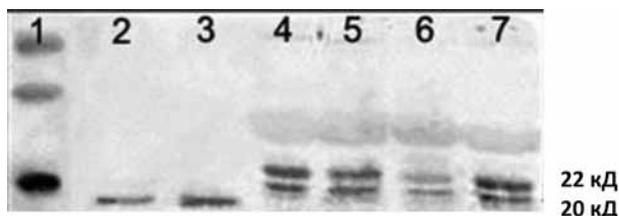


Рис. 13. Результаты Вестерн-блот анализа молока трансгенных мышей с использованием антител против Г-КСФ человека. 1 – маркеры с различными молекулярными весами, в кД; 2, 3 – препараты рекомбинантного Г-КСФ человека (негликозилированный -20 кД); 4–7 – молоко трансгенных самок, содержащее как гликозилированную форму Г-КСФ с молекулярным весом 22 кД, так и негликозилированную форму



Рис. 14. Образец молока трансгенной мыши

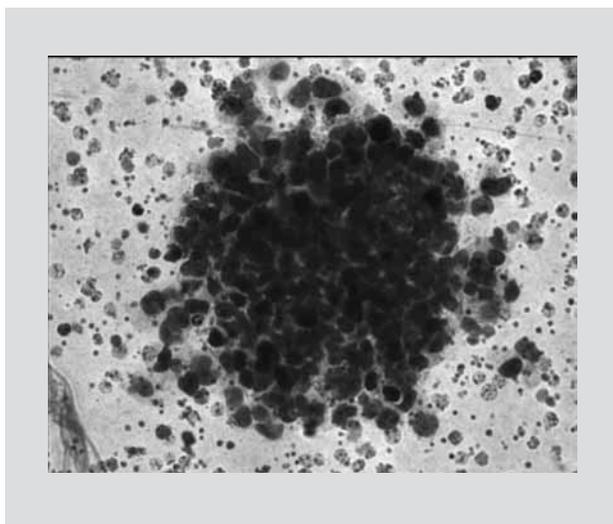


Рис. 15. Колония клеток-предшественников гранулоцитарного ряда, полученная из клеток пуповинной крови человека после обработки молоком трансгенной мыши (разведение 30 000 раз)

Такой эксперимент был проведен, и в результате были получены трансгенные козы, несущие такую же конструкцию. Анализ молока трансгенных коз подтвердил, что в период лактации уровень Г-КСФ человека в молоке достигал 2 мл/мл. Это достаточный уровень для использования молока трансгенных коз как источника получения препарата Г-КСФ человека для медицинской практики.

В настоящее время получены различные виды трансгенных животных, секретирующих с молоком рекомбинантные белки человека. Некоторые из таких белков находятся на стадии клинических испытаний либо уже представлены на фармацевтическом рынке (см. табл.). Так, например, белок антитромбин-3 человека (торговая марка ATryn, GTC Biotherapeutics, USA), продуцируемый в молочной железе трансгенных коз, успешно прошел все фазы преклинических и клинических испытаний и в данный момент существует в продаже. В клинике ATryn используется для восстановительной терапии пациентов, перенесших кардиопульмонарное шунтирование. В настоящее время, с использованием молочных биореакторов, компанией GTC Biotherapeutics получены, по крайней мере, еще 11 различных ценных белков человека. Другая биотехнологическая компания, Pharming BV, наладила выпуск фермента альфа-глюкозидазы человека, продуцируемого в молоке трансгенных кроликов.

Интерес представляет также относительно новое направление в трансгенезе сельскохозяйственных животных – продукция в молочной железе особых рекомбинантных белков-антидотов. В частности, это антидоты против фосфорорганических соединений, используемых в химической промышленности и в качестве инсектицидов в сельском хозяйстве. Одним из таких белков является фермент бутирилхолинэстераза. К настоящему времени рекомбинантная бутирилхолинэстераза уже получена в молочной железе трансгенных мышей и коз, ее концентрация в молоке составляет до 5 г/л. Резюмируя вышеописанное, можно констатировать, что использование трансгенных животных в качестве биореакторов – реальность с хорошей перспективой развития в будущем.

Перечень белков, получаемых из молока трансгенных животных, отобранных для создания терапевтических препаратов [6, 9]

Препарат	Компания	Биореактор	Стадия подготовки препарата
Атруп (рекомбинантный антитромбин III человека)	GTC Biotherapeutics	Коза	Европа: Одобрено ЕМЕА США: одобрено FDA
Ингибитор С-1-эстеразы	Pharming	Кролик	Фаза 3
ММ-093 (Альфа-фетопротеин)	Merrimack and GTC Biotherapeutics	Коза	Фаза 2
Альфа-глюкозидаза	Pharming	Кролик	США: Фаза 3, Европа: одобрено ЕМЕА.
Гормон роста человека	BioSidus	Корова	Предклинические испытания
Альбумин	GTC Biotherapeutics	Корова	Предклинические испытания
Фибриноген	Pharming	Корова	Предклинические испытания
Коллаген	Pharming	Корова	Предклинические испытания
Лактоферин	Pharming	Корова	Предклинические испытания
Альфа-1 Антитрипсин	GTC Biotherapeutics	Коза	Предклинические испытания
Малярийная вакцина	GTC Biotherapeutics	Коза	Предклинические испытания
Моноклональные антитела CD 137 (4-1BB)	GTC Biotherapeutics	Коза	Предклинические испытания

Список использованных источников

- Differential H4 acetylation of paternal and maternal chromatin precedes DNA replication and differential transcriptional activity in pronuclei of 1-cell mouse embryos / P.G. Adenot [et al.] // *Development*. – 1997. – Vol. 124. – P. 4615–4625.
- Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs / R.L. Brinster [et al.] // *Cell*. – 1981. – Vol. 27. # 1/pt2. – P. 223–231.
- Relevance of BAC transgene copy number in mice: transgene copy number variation across multiple transgenic lines and correlations with transgene integrity and expression / K.J. Chandler [et al.] // *Mamm. Genome*. – 2007. – Vol. 18. – P. 693–708.
- Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA / J.W. Gordon [et al.] // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. – 1980. – Vol. 77. – P. 7380–7384.

- Gordon, J.W. *Transgenic Technology and Laboratory Animal Science* / J.W. Gordon // *LAR J.* – 1997. – Vol. 38. – P. 32–41.
- Kues, W.A. *Advances in farm animal transgenesis* / W.A. Kues, H. Niemann // *Prev. Vet. Med.* – 2011. – Vol. 102. – P. 146–156.
- Le Saux, A. Chromosome integration of BAC (bacterial artificial chromosome): evidence of multiple rearrangements / A. Le Saux, L-M. Houdebine, G. Jolivet // *Transgenic Res.* – 2010. – Vol. 19. – P. 923–931.
- Pronuclear embryo yield in Caninder and Saanen goats for DNA microinjection / R.R. Moura [et al.] // *Reprod Dom Anim.* – 2010. – Vol. 45. – P.e101–e106.
- Niemann, H. Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine / H. Niemann, W.A. Kues // *Anim. Reprod. Sci.* – 2003. – Vol. 79. – P. 291–317.

10. Specific expression of an elastase-human growth hormone fusion gene in pancreatic acinar cells of transgenic mice / DM. Ornitz [et al.] // *Nature*. – 1985. – Vol. 13. – P. 600–602.

11. Sequence and chromosomal context effects on variegated expression of keratin 5/lacZ constructs in stratified epithelia of transgenic mice / A. Ramírez [et al.] // *Genetics*. – 2001. – Vol. 158. – P. 341–350.

12. A 3,387 bp 50-flanking sequence of the goat alpha-S1-casein gene provides correct

tissue-specific expression of human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) in the mammary gland of transgenic mice / IA. Serova [et al.] // *Transgenic Res.* – 2011. – Vol. 21. – P. 485–498.

13. Varmus, H. *Retroviruses* / H. Varmus // *Science*. – 1988. – Vol. 240. – P. 1427–1435.

14. *Retroviruses* / Eds. J.M. Coffin, S.H. Hughes, H.E. Varmus. – Cold Spring Harbor (NY), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.

Дата поступления статьи 29 сентября 2014 г

РОЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ ДНК В ОЦЕНКЕ ИНДИВИДУАЛЬНОГО РИСКА РАЗВИТИЯ БОЛЕЗНИ

Обзорная статья

¹Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук
Российская Федерация, 630090, г. Новосибирск, пр-т ак. Лаврентьева, 10

²Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины Сибирского отделения
Российской академии медицинских наук

Российская Федерация, 630089, г. Новосибирск, ул. Б. Богаткова, 175/1

³Новосибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации
Российская Федерация, 630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52

Необходимость оценки риска развития заболевания у пробанда или риска повторного случая заболевания в семье является постоянной в практике врача-генетика и рассматривается собственно как одна из главных целей медико-генетического консультирования. Одна из главных трудностей на этом пути – поиск этиологии заболевания, поскольку именно она во многом определяет риск повторного случая в семье. Грубую хромосомную патологию, как правило, можно заподозрить уже при первичном осмотре и подтвердить или исключить с помощью цитогенетического исследования.

Мелкие хромосомные аберрации при цитогенетическом исследовании с простой дифференциальной окраской уже могут быть пропущены. Для их диагностики необходимо использовать FISH-метод, который малодоступен и дорог, или CGH-чипы (сравнительная геномная гибридизация, или Comparative Genomic Hybridisation), Разрешающая способность этого метода существенно выше, чем FISH. Его даже предлагалось использовать в случаях неясной клинической картины с целью помочь в постановке правильного диагноза. Но оказалось, что имеется значительное количество мелких хромосомных перестроек (инсерций, делеций, дупликаций, CNV и т.д.) с неизвестным влиянием на фенотип. Для правильной клинической интерпретации таких изменений необходимо иметь: 1) обширную базу данных, в которой совмещены результаты агау-CGH-анализа с описанием фенотипа; 2) возможность выполнения такого анализа у кровных родственников пробанда с наличием и отсутствием патологического фенотипа.

В отношении моногенных заболеваний большие надежды возлагались на ДНК-диагностику. Казалось, что с завершением программы «Геном человека» ситуация с оценкой риска развития моногенных заболеваний кардинально изменится. И она действительно изменилась: были идентифицированы причинные мутации большого количества наследственных заболеваний. Первоначально пенетрантность мутаций оценивалась на семейном материале, когда в анализ брались пробанды и их кровные родственники. По мере совершенствования методик молекулярно-генетических исследований и снижения их стоимости появилась возможность формировать большие популяционные выборки и проводить в них детекцию носителей мутаций в генах частых моногенных заболеваний и уже после этого оценивать их состояние здоровья. Одной из предпосылок для такого рода исследований была проверка целесообразности популяционного скрининга на носительство мутаций в генах частых моногенных заболеваний с целью проведения в последующем мероприятий по первичной профилактике этих заболеваний. На этом пути был сделан ряд находок, которые показали, что при оценке риска развития моногенных заболеваний появились новые данные, вызывающие серьёзные затруднения при интерпретации в следующих ситуациях: 1) риск развития аутосомно-доминантного заболевания у носителя мутации; 2) риск развития клинических проявлений у гетерозиготного носителя мутации аутосомно-рецессивного заболевания; 3) риск развития аутосомно-рецессивного заболевания у гомозиготного носителя мутации. Результаты исследований, построенных на прин-

ципах доказательной медицины, позволяющих сделать обоснованные прогнозы риска в выше-названных ситуациях, пока явно недостаточно. Разберём это на примерах.

1. Вульгарный ихтиоз (ВИ) – заболевание, описанное очень давно, тип наследования – аутосомно-доминантный. Снижение количества или отсутствие белка филагрина в клетках эпидермиса открыли ещё в 70-е годы прошлого века, ген филагрина описали в 80-е годы, а связь мутаций в гене *FLG* с ВИ показали только в 2006 году. Smith и соавторы (2006) считают, что ВИ является заболеванием с неполным доминированием (semidominant) [1]. Ещё на заре развития медицинской генетики предполагали, что по мере накопления фундаментальных знаний доля мультифакториальных заболеваний в структуре патологии человека будет уменьшаться за счёт перехода части случаев в категорию моногенных. Одним из ярких примеров такого рода стал атопический дерматит (АД). Согласно последним западноевропейским данным, около половины больных имеют мутацию в гене филагрина [2]. В Новосибирске 44% больных с ВИ имеют делецию 2282del4 в гене *FLG*. Из 881 человека популяционной выборки 4 % имеют эту мутацию [3]. Частота ВИ в Новосибирске приблизительно составляет 1 на 9600 жителей. Таким образом, получается, что частота заболевания в Новосибирске примерно в 384 раза меньше, чем частота носительства делеции. То есть пенетрантность мутации составляет всего лишь 0,26 %. Конечно тот факт, что аутосомно-доминантные заболевания имеют разную степень пенетрантности и экспрессивности был известен задолго до появления современных молекулярно-генетических методов исследования. Например, нередкое явление при аутосомно-доминантных заболеваниях так называемый «пропуск поколения». Но, тем не менее, при ВИ, как АД заболевании в семьях риск проявления клинических симптомов у носителей мутации намного выше, чем в популяции. Видимо, мутации в гене филагрина являются главным необходимым фактором развития болезни, но недостаточным.

Филаггрин – это главный компонент барьера, который предотвращает не только потерю воды, но и попадание аллергенов и инфекционных

агентов во внутреннюю среду организма. Показано, что полиморфизм числа tandemных повторов гена филагрина ассоциирован с сухостью кожных покровов [4]. По данным R.S. Ginger и соавторов (2005), у носителей аллеля с 12 повторами сухость кожных покровов встречается в 4 раза реже, чем у носителей других аллелей. Можно предположить, что вероятность клинических проявлений вульгарного ихтиоза, атопического дерматита у гетерозигот по мутациям в сочетании с носительством аллеля с 12 повторами будет меньше, по сравнению с гетерозиготами в сочетании с аллелями с меньшим количеством повторов. Отчасти оправданность такого предположения косвенно подтверждают результаты исследования, в котором было доказано нарушение барьерной функции кожи с повышением её проницаемости у больных с атопическим дерматитом, в том числе и на непоражённых участках кожи [5].

Какие ещё факторы влияют на пенетрантность и экспрессивность, пока можно только догадываться. И если негенетические факторы исследованы достаточно хорошо, то генетические мы только начинаем изучать, особенно их взаимодействие. Например, неизвестно, влияет ли значительная вариабельность в последовательности повторов на функциональные свойства филагрина. Возможно, мы имеем дело с очередным примером олигогенного заболевания, которых описано уже немало [6]. C.N. Palmer и соавторы (2006) показали [7], что в семьях с вульгарным ихтиозом многие гомозиготы и гетерозиготы по мутациям в гене *FLG* также имеют атопический дерматит, а в части случаев и бронхиальную астму. Атопический дерматит встречался у лиц с мягкими проявлениями вульгарного ихтиоза, которые оказались гетерозиготами по одной из мутаций (R501X или 2282del4). Но ещё чаще он присутствовал у лиц с выраженными проявлениями вульгарного ихтиоза, которые были гомозиготами или компаунд-гетерозиготами по описанному двум мутациям. Никто из членов семей без этих мутаций не имел атопического дерматита. Атопический дерматит в этих семьях наследовался, как полудоминантный признак, с высокой пенетрантностью у гомозигот и компаунд-гетерозигот и низкой пенетрантностью у гетерозигот. В другом исследовании была показана ассоциация этих мутаций с атопическим дерматитом (уровень Ig E) с повы-

шенной исчерченностью ладоней у больных, страдающих атопическим дерматитом [8]. Хотя по нашим расчётам пенетрантность в виде фенотипа АД у гетерозигот не получается низкой [9]: частота гетерозиготного носительства мутации 2282del4 в популяции Новосибирска – 4 человека из 100, при этом частота АД по последним данным достигает 20 человек из 100, а частота мутации при АД – около 13%. То есть минимум 2 человека из 20 с АД имеют эту мутацию, тогда как на 100 человек популяции – всего 4 носителя. Таким образом, получается, что проявления в виде АД имеются у 2-х из 4-х носителей мутации 2282del4 – пенетрантность минимум 50% – не получается назвать низкой, особенно в сравнении с 0,26% пенетрантности в виде ВИ. Какие факторы определяют вариант фенотипических проявлений: ВИ, АД или и то и другое одновременно, пока остаётся неизвестным. И соответственно корректно оценить риск развития того или иного фенотипа у конкретного индивидуума, основываясь только на данных о наличии мутации в гене *FLG* в гетерозиготном состоянии, пока не представляется возможным. И только объединив данные генотипирования с семейным анамнезом, мы можем оценить риск развития заболевания и предложить более эффективные пути индивидуальной профилактики [10]. Тактика ведения больных с АД и ВИ отличается. Поэтому представляется целесообразным выполнение генотипирования на наличие мутаций 2282del4 и R501X в гене филагтрина всех больных с ВИ и АД с целью внесения изменений в план ведения больных-носителей этих мутаций. Пока мы находимся на этапе накопления знаний, семейный анамнез остаётся тем интегральным показателем, на который можно опереться при интерпретации данных исследований ДНК. Генотипирование может быть использовано для выявления детей (в семьях больных), предрасположенных к развитию АД, и проведения целенаправленной первичной профилактики.

2. Влияние гетерозиготного носительства мутаций в генах аутосомно-рецессивных заболеваний изучается не одно десятилетие. Но в целом ситуацию можно характеризовать следующим образом: до тех пор, пока исследовались частоты мутантных аллелей, в группах больных нередко находили повышение этих частот по сравнению с контролем, из чего делали вывод о вкладе изучаемых мутаций в развитие

заболевания. При «обратном» подходе, когда исследуется большая популяционная выборка, находятся гетерозиготные носители мутации и сравниваются с «неносителями» по доле больных – различия часто отсутствуют.

Так, среди больных с хроническим панкреатитом и хроническими обструктивными заболеваниями лёгких в части исследований было показано повышение частоты мутации $\Delta F508$ гена *CFTR*. В исследовании, выполненном в Новосибирске, сравнили частоту хронических заболеваний лёгких и желудочно-кишечного тракта в популяционной выборке. Обследованные лица были разделены на две группы: 1-я группа – носители мутации $\Delta F508$ в гене муковисцидоза *CFTR* (109 человек); 2-я группа – 9288 человек, не имеющих этой мутации. Статистически значимых различий по частоте заболеваний лёгких, а также ЖКТ и другим фенотипическим признакам между группами выявить не удалось, за исключением бронхиальной астмы и пиковой скорости выдоха [11]. Частота гетерозиготного носительства мутации $\Delta F508$ в гене *CFTR* в популяции Новосибирска 1:86, что соответствует частоте заболевания 1:12500, или примерно в 5 раз меньше, чем в Западной Европе (если полагать, что мутацией $\Delta F508$ обусловлено 50% всех случаев муковисцидоза). Это ещё одно свидетельство необходимости проведения исследований на каждой популяции, чтобы избежать ошибок, связанных с попытками экстраполяции данных, полученных на одной популяции, на другую. Хотя гомозиготные мутации при *CFTR* считаются почти 100%-но пенетрантными, усложняет задачу значительная фенотипическая изменчивость, особенно в отношении тяжести легочных проявлений. Некоторые из этих изменений можно объяснить аллельной гетерогенностью, но есть случаи, когда у пациентов, имеющих одинаковые аллели, обнаруживают разные легочные фенотипы [6]. Влияние факторов внешней среды не объясняет всех изменений, что позволяет предполагать наличие сопутствующих «генетических модификаторов» – генов, изменяющих тяжесть болезни, но не обязательно вызывающих её. Последние исследования ассоциаций выявили корреляцию тяжести отдельных фенотипов *CFTR* с аллелями ряда генов: *MBL*, *TNFA*, *TGFBI*. Важно иметь в виду, что многие из этих генов-модификаторов содержат полиморфиз-

мы, то есть, генетические варианты, присутствующие по крайней мере у 1% популяции. Следовательно, тяжесть болезни существенно зависит от присутствия или отсутствия частых генетических вариантов, вклад которых зависит от окружения. Влияние этих частых вариантов, большинство из которых – функциональные однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), а также варианты числа копий (CNV), протяженные (около 1 млн п.о.) делеции и дупликации у здоровых, обычно остается незамеченным. Однако при наличии гомозиготной мутации, например, ΔF508 в гене *CFTR*, эффекты этих полиморфизмов становятся очевидными и могут оказаться как протективными, так и потенцирующими заболевание. Так, у пациентов с муковисцидозом некоторые полиморфизмы гена *NOS1*, обуславливающие высокий уровень синтеза окиси азота, ассоциированы с более медленным ухудшением функции легких. Таким образом, всегда важно оценивать влияние локуса, вызывающего болезнь, в контексте всего уникального генетического фона (генома) человека [6].

3. Если при аутосомно-доминантных заболеваниях давно известен факт значительной вариабельности в пенетрантности гена, вплоть до «пропуска поколения», хотя и не предполагалось, что пенетрантность может быть настолько маленькой, то при аутосомно-рецессивных заболеваниях (особенно обмена веществ) она всегда считалась пренебрежимо малой, не заслуживающей внимания. Так при наследственном гемохроматозе частота гомозигот Y282Y в гене *HFE* может достигать 80–100%. Распространенность заболевания, позднее время появления клинических проявлений, с одной стороны, и наличие простых и доступных методов профилактики – с другой, заставляли думать о целесообразности популяционного скрининга. Но когда такие попытки были сделаны, оказалось, что у женщин-гомозигот по мутации C282Y пенетрантность не достигает и 2%. Такое различие в частотах гомозигот по мутации у больных с гемохроматозом (80–10%) и заболевания гемохроматозом при наличии гомозиготности по мутации (менее 2% у женщин) при аутосомно-рецессивной патологии трудно было даже предположить. Лишний раз подчёркивает недостаточное понимание тонких механизмов реализации мутации в конкретном генном окружении и условиях среды тот факт, что

у мужчин-гомозигот по мутации C282Y пенетрантность составляет почти 30% [12]. Сейчас наследственный гемохроматоз считается олигогенным заболеванием. Показано, что локусная гетерогенность существует при редких формах гемохроматоза, вызванных мутациями в генах, кодирующих рецептор трансферрина 2 (*TFR2*), ферропортин 1 (*FPN1*), антимикробный пептид гепсидина (*HAMP*) и гемоювелин (*HJV*). То есть гемохроматоз возникает или модифицируется в результате взаимодействия многих генов: например, более ранний возраст начала коррелирует с большей тяжестью болезни у пациентов, гомозиготных по мутации C282Y гена *HFE*, в сочетании с гетерозиготными мутациями в одном или в двух из генов, вызывающих юношеские формы гемохроматоза, *HJV* и *HAMP*. Таким образом, при олигогенных заболеваниях как вероятные причинные гены-кандидаты, так и модифицирующие аллели часто обнаруживаются на том же метаболическом пути, что и главный локус болезни. Что не удивительно, так как именно генетический груз в любом физиологическом процессе определяет размах и тяжесть клинических проявлений [6].

Оценка риска развития мультифакториальных заболеваний с учётом данных по полиморфизмам генов-кандидатов представляется ещё более трудной задачей. Так, по мнению M.P. Donahue и A.S. Allen (2005) минимальный необходимый объём выборки для ассоциативного исследования – 550 человек при частоте аллеля 40% и относительном риске 1,6; тогда как при частоте аллеля 20% и относительном риске 1,2 требуется уже выборка в 6000 человек [13]. Но поскольку вклад отдельного полиморфизма очень невелик, то предпринимались попытки улучшить надёжность прогноза путём увеличения количества ОНП. Однако это приводило к тому, что найденная комбинация аллелей риска изучаемых ОНП встречалась в популяции крайне редко и не имела практического значения. Решение этой проблемы видится в биоинформационном подходе, построении сетей обмена и разработке новых алгоритмов анализа для обработки колоссальных объёмов информации, которые генерируются современными методами изучения генома, транскриптома, протеома, микробиома. Биоматериал и данные для такого анализа аккумулируются на базе крупных национальных биобанков (США,

Англия, Австралия и др.). В конце 2012 года британским правительством был одобрен проект по секвенированию 100 тысяч геномов с целью получить лучшее понимание процессов развития заболеваний и поиска эффективных способов лечения. Гарвардская медицинская школа поставила перед собой цель секвенирования и публикации готовых геномов и медицинских документов 100 тысяч добровольцев, как вклад в развитие персонализированной медицины (Персональный геномный проект – PGP). Активно обсуждается возможность применения полногеномного секвенирования для скрининга новорожденных [14].

Применение достижений современных молекулярно-генетических технологий в медицине требует чёткого понимания тех ограничений, которые обусловлены самими методами, и главное, пока недостаточными нашими знаниями о возможных механизмах реализации индивидуальной генетической программы в конкретных условиях среды. И даже если полное секвенирование генома станет доступно каждому пациенту, много лет пройдёт прежде, чем мы полностью поймём роль определенных генетических факторов и их взаимодействия с экологическими факторами в здоровье и болезни [10]. По крайней мере, до этого времени следует объединить данные генотипирования с семейным анамнезом, чтобы более корректно оценить риск развития заболевания и предложить эффективные пути индивидуальной профилактики.

Вышеизложенное, по нашему мнению, должно стать поводом не для усложнения процедуры внедрения достижений современных молекулярно-генетических технологий в медицину, но для более осознанного их применения с пониманием существующих ограничений.

Список использованных источников

1. Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause *Ichthyosis vulgaris* / Smith, F.J.D. [et al.] // Nat Genet. – 2006. – Vol. 38 (3). – P. 337–342.
2. Comprehensive analysis of the gene encoding filaggrin uncovers prevalent and rare mutations in *Ichthyosis vulgaris* and atopic eczema / A. Sandilands [et al.] // Nat Genet. – 2007. – Vol. 39 (5). – P. 650–654.
3. Делеция 2282del4 в гене филаггрина в популяции жителей Новосибирска и у больных

вульгарным ихтиозом / В.Н. Максимов [и др.] // Медицинская генетика. – № 8. – 2007. – С. 21–23.

4. Filaggrin repeat number polymorphism is associated with a dry skin phenotype / R.S. Ginger [et al.] // Arch Dermatol Res. – 2005. – Vol. 297 (6). – P. 235–241.

5. Altered penetration of polyethylene glycols into uninvolved skin of atopic dermatitis patients / I. Jakasa [et al.] // Invest Dermatol. – 2007. – Vol. 127. – P. 129–134.

6. Генетика человека по Фогелю и Матулски. Проблемы и подходы / М.Р. Спейчер [и др.] – 4-е изд. – СПб.: Изд-во Н-Л, 2013. – 1056 с.

7. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis / C.N.A. Palmer [et al.] // Nat Genet. – 2006. – Vol. 38 (4). – P. 441–446.

8. Loss-of-function variations within the filaggrin gene predispose for atopic dermatitis with allergic sensitizations / S. Weidinger [et al.] // J Allergy Clin Immunol. – 2006. – Vol. 118 (1). – P. 214–219.

9. Мутации в гене филаггрина и атопический дерматит / Ю.В. Максимова [и др.] // Клиническая дерматология и венерология. – № 3. – 2014. – С. 58–62.

10. Guttmacher, A.E. The Family History – More Important Than Ever / A.E. Guttmacher, F.S. Collins, R.H. Carmona // The New England Journal of Medicine. – 2004. – Vol. 25. – P. 2333–2336.

11. Frequency of cystic fibrosis $\delta f508$ mutation in adult and elderly caucasian population of North Asia and its association with common chronic diseases / M.I. Voevoda [et al.] // HUGO J. – 2011. – 5:1-346.

12. Iron-overload-related disease in HFE hereditary hemochromatosis / K.J. Allen [et al.] // N Engl J Med. – 2008. – Vol. 358 (3). – P. 221–230.

13. Donahue, M.P. Genetic association studies in cardiology / M.P. Donahue, A.S. Allen // Am. Heart J. – 2005. – Vol. 149. – P. 964–970.

14. Meade, C. Newborn screening: adapting to advancements in whole-genome sequencing / C. Meade, N.F. Bonhomme // Genet Test Mol Biomarkers. – 2014. – Vol. 18 (9). – P. 597–598.

Дата поступления статьи 1 октября 2014 г.

ПАЛЕОГЕНЕТИКА: ПРОИСХОЖДЕНИЕ ЧЕЛОВЕКА И ЭТНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ РЕКОНСТРУКЦИИ

Обзорная статья

Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук
Российская Федерация, 630090, г. Новосибирск, пр-т ак. Лаврентьева, 10

Введение

Развитие методов получения и анализа структуры образцов ДНК непрерывно расширяет спектр объектов, пригодных для молекулярно-генетического анализа. Одним из наиболее значимых достижений в этом направлении стало развитие методов исследования ДНК из биологических останков различного возраста и происхождения, так называемой древней ДНК. В современной молекулярной генетике это направление получило общее название – палеогенетика. В круг объектов исследования палеогенетики входят все останки организмов (включая и микроорганизмы), которые потенциально могут содержать аутентичную ДНК, не прошедшие после смерти организма процедуру направленной консервации нуклеиновых кислот [31]. По свойствам исследуемых материалов, задачам и основным методическим приемам к палеогенетике тесно примыкает молекулярно-генетическое направление судебно-медицинской экспертизы [16]. Это направление демонстрирует высокое практическое значение методов анализа деградированных образцов ДНК из биологических останков.

В настоящее время палеогенетика представлена широким спектром направлений, отличающихся по видовой принадлежности исследуемых останков и целям их исследования, и является одним из наиболее востребованных и перспективных направлений молекулярной генетики, без которого невозможно представить себе эффективное решение многих задач в области эволюции, филогении, этнокультурных реконструкций и многих других.

С момента появления первых палеогенетических публикаций в престижных научных журналах в середине 1980-х годов [26, 53] палеогенетика прошла сложный путь становления в качестве полноценного научного направления. Первоначальный оптимизм исследователей,

приведший к лавинообразному увеличению числа работ и спектра останков, вовлеченных в палеогенетическое исследование в первые годы развития палеогенетики [23, 25, 50, 54, 57, 67], сменился глубоко пессимистичным отношением многих исследователей к возможности получать полноценные достоверные данные о структуре древней ДНК [22, 62, 64]. Это было связано с накоплением первоначальных данных о свойствах древней ДНК (включая ее чрезвычайно деградированное состояние) и связанной с ними проблеме контаминации – загрязнения древних материалов современной ДНК, приводящего к получению ложных результатов даже при незначительной примеси современной ДНК в экстракте из древних останков.

Наличие проблемы с верификацией палеогенетических результатов на долгие годы задержало полноценное развитие многих направлений палеогенетики, особенно связанных с анализом ДНК из останков анатомически современного человека и ДНК микроорганизмов, для которых риск влияния контаминации особенно велик. В то же время значительное число исследовательских коллективов продолжали исследования древней ДНК. Одним из основных направлений палеогенетики этого периода является накопление всесторонних данных о свойствах древней ДНК в останках, характере и механизмах ее деградации после смерти организма, влияния на эти процессы различных факторов внешней среды, в которой находятся останки, методах максимально эффективного извлечения деградированной ДНК из различных типов материалов (см., например: [24, 27, 28]). Результатом этой работы стало создание к началу 2000-х годов протоколов проведения палеогенетических исследований, учитывающих свойства древней ДНК и опасность контаминации и обеспечивающих верификацию полученных палеогенетических данных [9].

Особенности таких протоколов и возможные меры по верификации палеогенетических данных широко освещены в научной литературе (см., например, [55, 73]). Это стало важным шагом к становлению палеогенетики в качестве полноценного раздела молекулярной генетики, позволяющего получать высокодостоверную научную информацию. С этого момента наблюдается бурное развитие палеогенетических исследований, интенсивность которых во многом определяется дальнейшими методическими прорывами в области анализа структуры ДНК в целом и древней ДНК в частности.

Наиболее значимым методическим прорывом за последние годы стало появление методов высокопроизводительного секвенирования ДНК. Применительно к палеогенетике появление методов параллельного высокопроизводительного секвенирования позволило перейти от анализа единичных или немногочисленных фрагментов ДНК, как правило, представленных участками митохондриальной ДНК, реже Y-хромосомы и других отдельных ядерных локусов, к анализу протяженных участков геномов, вплоть до полногеномного исследования отдельных образцов (одни из первых работ – [19, 20]). Таким образом, внедрение высокопроизводительных методов секвенирования ДНК в практику палеогенетических исследований, с одной стороны, существенно расширило спектр генетических маркеров, доступных для исследования (а также масштаб палеогенетических исследований за счет возможности увеличения серий исследуемых образцов), а, следовательно, и перечень задач, эффективно решаемых с помощью анализа древней ДНК. С другой стороны, новые методы позволяют зафиксировать признаки деградированного состояния древней ДНК, отличающие ее от современной. Регистрация таких параметров, как соотношение фрагментов ДНК различной длины в экстракте, картины дезаминирования цитозина и вырожденности последовательности ДНК вследствие различных биохимических процессов, является лучшим на данный момент способом верификации палеогенетических данных [37, 38]. Установление признаков деградированного состояния древней ДНК входит и в стандартный протокол верификации данных, но высокопроизводительное секвенирование существенно облегчает этот процесс.

Таким образом, можно констатировать, что современный уровень развития методической базы палеогенетических исследований позволил приблизить потенциальную молекулярно-генетическую информативность многих древних образцов ДНК к образцам современной ДНК. Это касается, в первую очередь, образцов с относительно высокой степенью сохранности ДНК.

Преимуществом анализа древних образцов является возможность получения генетических характеристик особи, проживавшей в конкретный хронологический период, в определенном месте и контексте (средовом, археологическом и др.). Реализация этого преимущества напрямую зависит от корректности учета различных аспектов контекста исследуемых материалов. Ключевыми параметрами здесь являются точная датировка материала и его археологический контекст. Поэтому оптимальной стратегией для реализации масштабных палеогенетических исследований представляется тесное сотрудничество разноплановых специалистов, занятых исследованием анализируемых древних материалов (археологов, антропологов, палеозоологов и др.) и их объединение в междисциплинарный исследовательский коллектив, совместно осуществляющий все основные стадии исследования материалов – от корректной формулировки задачи и выбора адекватного материала до интерпретации полученных палеогенетических данных с учетом контекста исследуемого материала [2].

Источниками образцов древней ДНК в настоящее время служат разнообразные типы останков организмов и продуктов их жизнедеятельности. Безусловно, наиболее распространенным и информативным для палеогенетики типом биологических останков являются костные фрагменты скелета, в которых ДНК имеет наибольшие шансы избежать полной деградации [7]. Помимо костных останков, высокую информативность в качестве источника древней ДНК демонстрируют, например волосы [3], перья [49], скорлупа яиц [51], мумифицированные мягкие ткани, копролиты [17], растительные остатки и даже осадочные породы, содержащие останки организмов (части растений, пыльцу, останки микроорганизмов) [30].

Одним из центральных объектов палеогенетических исследований с самого появления данного направления и по настоящее время является исследование останков ДНК из останков человека [35]. Круг задач, решаемых с помощью анализа ДНК из останков человека, чрезвычайно широк – от изучения процессов становления анатомически современного человека как вида, последующих этапов формирования генетического состава современного коренного населения планеты, молекулярно-генетических механизмов адаптации человека к разнообразным условиям внешней среды, до реконструкции элементов социальной структуры древних сообществ человека и прикладных задач, решаемых методами палеогенетики в области судебно-медицинской экспертизы. Ввиду невозможности охарактеризовать в рамках данной работы все основные направления палеогенетических исследований останков человека, основное внимание будет уделено двум направлениям – проблеме формирования генофонда анатомически современного человека как вида и этногенетическим реконструкциям.

Формирование анатомически современного человека по данным палеогенетики

Область исследования происхождения анатомически современного человека на данный момент является наиболее ярким примером основополагающего вклада палеогенетических методов в развитие одного из актуальнейших направлений современной науки. Палеогенетические данные, полученные за последние 5 лет, привели к коренному изменению наших представлений о формировании генофонда современного человека.

Последние десятилетия XX века основные точки зрения на происхождение анатомически современного человека были связаны с двумя диаметрально противоположными гипотезами. Гипотеза недавнего африканского происхождения человека предполагает формирование анатомически современного человека на территории Африки менее 200 тыс. лет назад и его расселение за пределы Африки не более 70 тыс. лет назад без какого-либо смешения с другими представителями рода *Homo* [65, 66]. Альтернативная гипотеза – мультирегионального происхождения человека – пред-

полагает, что после первоначального расселения ранних (эректоидных) форм человека по планете, его эволюция шла относительно независимо в различных регионах планеты с последующим их смешением в контактных зонах, что привело к тому разнообразию популяций человека, которое мы наблюдаем на данный момент. Мультирегиональная гипотеза опиралась главным образом на данные палеонтологии, физической антропологии и археологии, свидетельствовавшие о длительных периодах независимой эволюции локальных форм древних людей и их культуры в различных регионах планеты [68, 74, 75]. Ведущий вклад в подтверждение гипотезы недавнего африканского происхождения сыграли данные популяционной генетики человека. Результаты исследования разнообразия локусов с однородительским наследованием, сначала митохондриальной ДНК (мтДНК) [8, 63, 71], а позднее Y-хромосомы [69], позволили убедительно продемонстрировать, что наибольшее их разнообразие (а следовательно, и время эволюции) демонстрируют популяции африканского континента. Более того, построение общечеловеческих филогений мтДНК и Y-хромосомы, показало, что все филогенетические кластеры этих локусов, обнаруженные за пределами Африки, имеют происхождение от африканских кластеров. Эти факты, наряду с датировками основных филогенетических линий мтДНК и Y-хромосомы, послужила убедительным доказательством справедливости гипотезы недавнего африканского происхождения [13; 63, 71]. Эта точка зрения оставалась доминирующей на протяжении более 20 лет с середины 1980-х годов, до появления принципиально новых данных палеогенетики.

Необходимо отметить, что данное направление палеогенетических исследований прошло начальный этап своего развития в 1990-е годы, еще до создания общепринятой системы верификации палеогенетических данных. Основные достижения в этот период были связаны не с анализом останков собственно анатомически современных людей, а с исследованием ДНК из останков неандертальцев. Генетические отличия неандертальцев (в частности их мтДНК) от анатомически современных людей позволяли в значительной мере успешно решать проблему контаминации

останков современной ДНК человека. Таким образом, исследования ДНК неандертальцев на этом этапе стали «флагманом» развития всего направления. Эту же роль они сыграли и в период внедрения в практику палеогенетических исследований высокопроизводительных методов секвенирования, когда исследования генома неандертальца (а позже, других представителей рода *Homo*) играли роль своеобразного «полигона» для развития и испытания возможностей высокопроизводительных методов секвенирования.

Однако первые существенные результаты были получены методами, основанными на использовании ПЦР. Анализ структуры гипервариабельных участков контрольного района мтДНК показал, что вариант мтДНК неандертальца выходит за рамки структурного разнообразия мтДНК современных популяций человека [40]. Впоследствии эти результаты были подтверждены для разных останков неандертальцев [39; 52]. Эти данные были интерпретированы как еще одно свидетельство в пользу справедливости гипотезы о недавнем африканском происхождении человека, так как подтверждали отсутствие существенного смещения анатомически современных людей с неандертальцами в процессе их расселения из Африки по территории Евразии [10].

Первое успешное использование методов высокопроизводительного секвенирования ДНК в палеогенетике также связано с анализом мтДНК неандертальцев. Полученные данные по полному митохондриальному геному подтвердили выводы, сделанные при анализе последовательности контрольного района [19].

Высокопроизводительные методы позволили приступить к анализу ядерного генома неандертальца. Его результаты оказались чрезвычайно важными для реконструкции процессов происхождения анатомически современных людей. Было обнаружено, что небольшой процент ядерного генома современных людей (2–4% для разных популяций) имеет неандертальское происхождение. Вклад неандертальцев был выявлен во всех, без исключения, популяциях человека за пределами Африки, но отсутствовал в коренных африканских группах (за исключением тех, которые имели интенсивные генетические контакты с населением прилегающих районов Евразии)

[20]. Гибридизация анатомически современного человека и неандертальца, по-видимому, происходила после выхода из Африки, на территории прилегающих регионов Евразии. Таким образом, впервые был показан вклад другого представителя рода *Homo* в генофонд современного человека.

Эти новые данные свидетельствовали о том, что ни одна из двух крайних точек зрения на происхождение человека, выраженных в двух рассмотренных выше гипотезах, не соответствует действительности в полной мере. По сути с открытием вклада неандертальца в генофонд современного человека начался переход от крайних точек зрения на формирование анатомически современного человека к варианту, учитывающему как доминирующий вклад популяций человека, мигрировавших с территории Африки, так и менее выраженный, но, тем не менее, очень важный вклад других представителей рода *Homo*, в первую очередь неандертальцев. Эту модель можно условно назвать гибридной. Значимость вклада неандертальцев демонстрируется, например, работами, в которых показано неандертальское происхождение аллельных вариантов некоторых генов иммунной системы, обеспечивающих защиту организма от различного рода инфекционных агентов [45]. Действительно, выглядит логичным предположение о том, что в генофондах мигрировавших из Африки популяций анатомически современных людей после смешения с неандертальцами в первую очередь могли закрепляться отбором генотипы, обеспечившие ранее неандертальцам адаптацию к более суровым и разнообразным условиям евразийского континента.

Другим чрезвычайно важным открытием в области ранней истории человека является обнаружение нового, как предполагается, неизвестного ранее науке представителя рода *Homo*. Анализ мтДНК из фрагмента дистальной фаланги ребенка, обнаруженного в верхнепалеолитическом слое Денисовой пещеры (возрастом около 50 тыс. лет) показал, что исследованный структурный вариант выходит за рамки разнообразия мтДНК современных людей и неандертальцев и представляет собой новую ветвь на филогенетическом дереве мтДНК рода *Homo* [37]. Был секвенирован сначала полный митохондриальный [37], а

затем и ядерный геном нового вида [46, 60], что подтвердило первоначальные выводы. Вид был назван денисовским человеком (по месту обнаружения останков – в Денисовой пещере, Горный Алтай, Россия). Это первый случай в научной практике, когда вид древнего человека выделен на основании анализа ДНК, а не морфологии останков (ввиду их немногочисленности и фрагментарности). Следует отметить, что называть денисовца новым видом можно с полным правом пока только с точки зрения молекулярной генетики. Дело в том, что коллекции останков гоминид, накопленные палеонтологами и антропологами, очень обширны и включают останки огромного количества форм, которые исследованы только с точки зрения морфологии скелета. Нельзя исключать, что денисовский человек представляет одну из форм, ранее известных по данным физической антропологии.

Сравнение с геномами представителей современных популяций человека из различных регионов планеты показало, денисовцы также внесли вклад в генофонд современного населения, но он, по-видимому, был более локальным: следы генетического влияния денисовского человека (до 5% генетического материала) были выявлены первоначально только у ряда аборигенных популяций Австралии. Для объяснения такой специфической картины была предложена модель двух поздних миграций человека из Африки. Первая ранняя волна мигрантов (~60–70 тыс. лет назад), выйдя из Африки, расселилась по побережью Индийского океана в Юго-Восточную Азию и Австралию. Эти мигранты подверглись гибридизации с денисовцами (их останки известны пока только в Денисовской пещере, но предполагается, что ареал этого населения был широким). Потомки этих ранних мигрантов сохранились в Австралии. Вторая волна миграции (~30 тыс. лет назад) привела к заселению континентальной Евразии, уже не испытав генетического влияния денисовского человека [61]. Таким образом, неандертальцы, по-видимому, не были единственными гоминидами, внесшими, наряду с африканскими популяциями, вклад в генофонд современного человека.

Следует отметить, что в настоящее время инициированы исследовательские проекты по поиску следов денисовского человека в гено-

фонде континентальных популяций Азии, как Южной, так и Северной. Одним из сигналов существования вклада денисовского человека в генофонд популяций может быть обнаружение необычного гаплотипа гена *EPAS1*, ответственного за адаптацию к гипоксии у коренного населения Тибета. Этот гаплотип, предположительно имел денисовское происхождение [29].

Археологические исследования последних лет убедительно доказали, что ареал неандертальцев в Евразии не ограничивался Европой и Ближним Востоком, распространялся на Среднюю и часть Центральной Азии, в частности Горный Алтай [36]. Таким образом, в конце эпохи позднего плейстоцена несколько десятков тысяч лет назад на территории Горного Алтая могли сосуществовать и взаимодействовать несколько видов гоминид. Останки гоминид из Горного Алтая являются, на данный момент центральными объектами исследования данной области палеогенетики. В частности, был секвенирован полный геном неандертальца из кости стопы, обнаруженной в той же денисовской пещере [58]. Сравнительный анализ данных показал, что в этой части Евразии существовала сложная картина взаимодействия поздних гоминид между собой. В частности, обнаружен вклад неандертальцев в геном денисовца, а также вклад в геном денисовца какого-то неизвестного вида древних гоминид. Кроме того, зафиксированы признаки вклада денисовцев в генофонд населения континентальной Азии (требуется дальнейшее подтверждение).

Таким образом, в настоящее время процесс формирования генетического состава современного населения планеты представляется в виде сложного сочетания доминирующей миграции анатомически современных людей из Африки и менее выраженного вклада других видов гоминид. Значение этого вклада для становления современного населения еще предстоит точно установить. Данное направление находится в процессе накопления критической массы данных и еще далеко от формирования окончательных представлений. Об этом свидетельствует, в частности, тот факт, что получение данных практически по каждому новому образцу эпохи плейстоцена приводит к существенным изменениям всей модели. Кроме

того, определенную сложность представляют методы биоинформационной обработки и интерпретации полногеномных данных о древних индивидах. В любом случае, в этом направлении можно ожидать появления новых впечатляющих результатов в самое ближайшее время. В частности, происходит расширение круга плейстоценовых останков, вовлеченных в исследование. Ярким свидетельством этого является анализ полного митохондриального генома древнего гоминида возрастом около 400 тыс. лет с территории Испании, по морфологии скелета близкого гейдельбергскому человеку [47].

Другим направлением исследований является секвенирование геномов ранних представителей анатомически современного населения Евразии. Так, были получены данные, свидетельствующие о генетической близости отдельных групп верхнепалеолитического населения Восточной Сибири к западно-евразийским популяциям [59]. Большой интерес представляют результаты секвенирования генома анатомически современного человека возрастом 45 тыс. лет с территории Западной Сибири [15]. Полученные результаты позволили провести оценку возраста гибридизации анатомически современных людей и неандертальцев, а также заново оценить скорость накопления мутаций в аутосомах, Y-хромосоме и митохондриальной ДНК.

Появление все новых и новых данных о генофонде древних людей эпохи плейстоцена непрерывно дополняет наши представления о ранних этапах формирования современного населения планеты. Это направление будет оставаться одним из наиболее информативных в данной области эволюционной биологии в ближайшие годы.

Этногенетические реконструкции методами палеогенетики

Специфика рассмотренных выше работ, посвященных анализу образцов ДНК из останков людей эпохи плейстоцена, определяется прежде всего крайней малочисленностью такого материала. В связи с этим, для каждого образца получают максимально возможную информацию, которая позволяет реконструировать отдельные, как правило наиболее общие, свойства процессов ранних этапов становления че-

ловечества. В период голоцена, охватывающий последние ~12 тысячелетий, происходило существенное увеличение численности и плотности населения во многих регионах планеты. Это было обусловлено, в первую очередь, новым уровнем развития материальной культуры и хозяйственно-экономического развития людей. В начале эпохи голоцена получает широкое распространение и устойчивая традиция погребения останков умерших людей, что приводило к сохранности намного большего количества останков. Массовость и в целом более высокая сохранность палеоантропологического материала эпохи голоцена позволяют существенно расширить спектр направлений их исследования методами палеогенетики. К ним относятся и реконструкция генетической истории популяций, элементов их социального устройства, адаптации к быстро меняющимся условиям среды и уровню экономического развития, изучение патологий генетической и инфекционной природы и многие другие [2, 35]. Однако одним из центральных направлений палеогенетического исследования популяций голоцена, как и для предшествующих плейстоценовых групп, является реконструкция процессов формирования генетического состава населения. В случае голоценовых материалов речь, как правило, может идти о более детальной реконструкции истории популяций, учитывающей формирование локально-территориальной специфики населения.

В широком смысле под этногенетической реконструкцией обычно понимается комплекс исследований, направленных на получение данных об истории популяций человека, их генетического состава, развития элементов материальной и духовной культуры. Эти процессы приводят, в конечном счете, к формированию современных этнических групп различных регионов планеты. До развития палеогенетики для проведения этногенетических реконструкций использовались данные археологии и физической антропологии (работа с материалами от древних популяций человека, направленная на изучение процессов развития материальной культуры и морфологических особенностей населения) и этногеномики (изучение генофонда современных популяций и реконструкция событий их формирования по конечному результату). Существенный вклад, особенно

для поздних этапов истории популяций, играют также исследования в области этнографии, лингвистики и другие.

Методы палеогенетики позволяют непосредственно исследовать генофонд древних популяций человека с известной хронологией проживания и географической локализацией ареала, выявлять динамику генетического состава населения во времени и сопоставлять молекулярно-генетические данные с археологическими и антропологическими характеристиками. Таким образом, появляется возможность полноценно объединить разнонаправленные научные направления для проведения этногенетических реконструкций на новом доказательном уровне [2].

Генезис населения любой территории определяется совокупностью многочисленных частных факторов, таких как источник первоначального заселения территории, генетические связи синхронных групп населения между собой, степень генетической преемственности между одновременными группами, наличие и интенсивность миграционных процессов, и сопутствующих им процессов этнокультурного взаимодействия и многих других. Полноценная реконструкция генетической истории популяции должна привести к восстановлению картины основных действующих факторов и порядка их влияния на состав населения региона.

Спектр генетических маркеров, используемых для этногенетических реконструкций методами палеогенетики, определяется, с одной стороны, достижениями этногеномики, а с другой – методическими особенностями их анализа в древнем материале. Наиболее исследованными маркерами в этногеномике являются локусы с одnorodительским наследованием – мтДНК и Y-хромосома. Для них известна глобальная картина варибельности в генофондах всех основных регионов планеты, разработана классификация структурных вариантов и филогенетические отношения между ними [32, 70]. Опираясь на эти данные, исследователи могут определить точное филогенетическое положение практически любого структурного образца мтДНК или Y-хромосомы, а также использовать для интерпретации палеогенетических результатов филогеографический подход. Таким образом, в

случае с рассматриваемыми одnorodительскими локусами палеогенетическое исследование базируется на экспериментальном и аналитическом инструментарии, накопленном при проведении исследований современных популяций человека и адаптированном к специфике палеоматериала.

Наиболее популярным маркером для этногенетических реконструкций методами палеогенетики с самого начала развития данного направления и по настоящее время остается мтДНК. Это обусловлено как ее информативностью для реконструкции поздних этапов генетической истории популяций человека, так и удобством анализа структуры вариантов мтДНК в древнем антропологическом материале (имеется в виду возможность определения точного филогенетического положения структурного варианта мтДНК по результатам анализа небольшого числа ее коротких фрагментов), а также лучшей, по сравнению с локусами ядерного генома, сохранностью в останках, обусловленная большим исходным числом копий мтДНК в клетках организма.

Работы по анализу состава структурных вариантов мтДНК в генофондах древних популяций человека ведутся одновременно для многих регионов планеты. Наиболее интенсивно исследуется генофонд мтДНК древнего населения различных районов Европы [4, 5, 11, 21, 43], Центральной и Восточной Азии [33, 41, 72] и некоторых районов Сибири [18, 34, 48, 56] и другие. Длительное время такие работы носили разрозненный характер: в них исследовался состав вариантов мтДНК в отдельных небольших сериях образцов от представителей групп древнего населения, происходящих из географически удаленных регионов и/или относящихся к хронологически удаленным периодам. Их анализ проводился прежде всего методами филогеографии (с упором на данные по генофонду современных популяций человека). Интегральный анализ результатов таких исследований был проблематичен. Очевидно, что на этом этапе происходило медленное накопление первичного объема данных о древних популяциях, который позволил бы проводить более масштабные и целостные реконструкции. Существовали и до сих пор остаются актуальными проблемы с репрезентативностью исследо-

ванных выборок. Популяции огромных территорий до сих пор зачастую представлены крайне немногочисленными сериями образцов. Отдельной проблемой является слабый или некорректный учет археологического и антропологического контекста исследуемых материалов. Тем не менее, известны примеры работ, не всегда удачных, в которых анализ небольшой серии образцов мтДНК использовался для попыток реконструкции весьма масштабных и сложных процессов. Среди удачных примеров таких работ можно назвать серию исследований мезолитического и неолитического населения различных регионов Европы, которая позволила пролить свет на генетические аспекты неолитизации европейского континента [4, 21, 43].

На наш взгляд, многие из перечисленных выше затруднений могут быть с успехом преодолены при выполнении масштабных по численности образцов исследований древнего населения на региональном уровне. При этом одним из приоритетов должна являться реконструкция временной динамики генетического состава населения исследуемого локального региона.

Попытки таких исследований предпринимались для различных регионов, например, Казахстана, юга Сибири [34, 41]. Большинство этих работ, направленных на реконструкцию динамики структуры генофонда мтДНК, также столкнулись с проблемой низкой репрезентативности исследованных выборок. Эта проблема решается появившимися в последние годы более масштабными исследованиями.

Одна из таких работ реализуется нами для древнего населения западно-сибирской лесостепи (Барабинская лесостепь). В настоящее время мы заканчиваем формирование полного хронологического среза структуры генофонда мтДНК населения Барабинской лесостепи, охватывающего данные по структуре генофонда мтДНК населения региона за последние 8 тыс. лет – всего периода существования здесь постоянного и относительно многочисленного населения – от эпохи неолита до позднего средневековья и нового времени. Так, нам удалось реконструировать основные этапы формирования генофонда мтДНК населения Барабинской лесостепи в различные периоды эпохи бронзы и сопоставить основ-

ные культурные и демографические события, известные для данного периода по результатам археологических и антропологических исследований, с динамикой состава гаплогрупп мтДНК в генофонде населения (предварительные результаты этого исследования опубликованы [1, 48]). Параллельно мы ведем работу по получению аналогичных данных для нерекombинируемого участка Y-хромосомы и некоторых других ядерных локусов, включая полногеномные последовательности для отдельных индивидов (неопубликованные данные автора).

Аналогичные исследования проведены или инициированы для отдельных хронологических периодов различных регионов. Ярким примером является работа, посвященная динамике структуры генофонда мтДНК населения Германии эпохи неолита и бронзы, включающая данные о мтДНК более чем 300 индивидов, относящихся к различным периодам эпохи бронзы. Сопоставление палеогенетических данных с археологическим контекстом исследуемых материалов позволило выделить события, оказавшие наибольшее влияние на состав населения Центральной Европы в эпоху бронзы [5].

Одновременно с расширением масштаба исследований генофонда мтДНК древних популяций человека появляются работы по анализу небольших серий образцов Y-хромосомы из древних популяций (или анализу серий образцов по обоим локусам) [34, 76].

Очевидно, что исследования структуры генофондов древних популяций человека эпохи голоцена в ближайшие годы будут интенсифицированы. Одним из ключевых направлений будет оставаться анализ однородительских маркеров. Наряду с мтДНК и Y-хромосомой все большее значение будут приобретать другие ядерные маркеры, которые несут в себе основную часть генетической информации о древнем населении.

Осуществление подробной реконструкции этногенетических процессов в различных регионах планеты на высоком доказательном уровне потребует накопления многочисленных данных о структуре генофондов древних популяций. Ключевая роль в этом процессе безусловно принадлежит высокопроизводительным методам анализа структуры древней ДНК.

В последнее время уже осуществляется активное внедрение высокопроизводительных методов секвенирования ДНК в область этногенетических реконструкций по голоценовым палеоантропологическим материалам. Так, значительного прогресса удалось достичь в области анализа древней мтДНК. Применение методов высокопроизводительного секвенирования со специально разработанными процедурами направленного обогащения ДНК-библиотек [44], потенциально позволяет осуществлять анализ массовых серий полных митохондриальных геномов из голоценовых образцов. Результаты таких первых работ уже позволили, например, оценить достоверность принятой скорости накопления мутаций в мтДНК [14]. Очевидно, что возможность получения серий полных митохондриальных геномов позволяет максимально использовать филогенетическую информативность древних образцов мтДНК [6].

Широкие перспективы открывает возможность анализа многочисленных ядерных локусов с помощью высокопроизводительных методов. Одним из таких направлений, очевидно, является применение анализа многочисленных однонуклеотидных полиморфизмов, распределенных по всем участкам ядерного генома, и выявление признаков древнейших и более поздних процессов смешения генетически контрастных групп в истории популяций человека различных регионов [12].

Наибольшую информацию безусловно могут дать полные последовательности геномов представителей голоценового населения. Одной из первых впечатляющих работ в данном направлении стало исследование геномов представителей раннего голоценового населения Европы – представителя ранней группы с навыками сельскохозяйственного производства возрастом 7 тыс. лет с территории Германии, и восьми охотников-собирателей с территории Люксембурга и Швеции [42]. Их сравнение с геномами других представителей древнего и современного населения Евразии позволило установить вклад по меньшей мере трех основных предковых групп в генофонд современных европейцев: западно-евразийских охотников-собирателей; так называемых «северных евразийцев», генетически близких верхнепалеолитическому населению Сибири;

ранних носителей навыков сельского хозяйства с территории Европы (имеющих в основном ближневосточное происхождение).

На данном этапе анализ полных геномов древнего населения эпохи голоцена используется для реконструкции масштабных процессов без их детализации. Однако распространение практики секвенирования полных геномов, накопление серийных результатов для разных регионов и, что очень существенно, дальнейшее совершенствование биоинформационных методов анализа экспериментальных данных по полным древним геномам позволят перейти и к проведению более детальных этногенетических реконструкций.

Таким образом, к настоящему моменту имеются все необходимые предпосылки для бурного развития палеогенетических исследований, направленных на реконструкцию всех этапов формирования генофонда современного населения планеты. Помимо использования новых экспериментальных технологий, успех реализации данного направления исследований будет в значительной степени зависеть от интеграции усилий разноплановых специалистов (генетиков, археологов, антропологов) для совместной интерпретации накапливаемых данных соответствующих отдельных направлений при осуществлении комплексных реконструкций.

Список использованных источников

1. Мультидисциплинарные исследования населения Барабинской лесостепи V – I тыс. до н.э.: археологический, палеогенетический и антропологический аспекты / В.И. Молодин [и др.]. – Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2013. – 220 с.
2. Пилипенко, А.С. Палеогенетический анализ в археологических исследованиях / А.С. Пилипенко, В.И. Молодин // Информ. вестник ВОГиС. – 2010. – Т. 14, № 2. – С. 280–311.
3. DNA from keratinous tissue. Part I: hair and nail / C.F. Bengtsson [et al.] // Ann. Anat. – 2012. – Vol. 194. – P. 17–25.
4. Genetic discontinuity between local hunter-gatherers and central Europe's first farmers / B. Bramanti [et al.] // Science. – 2009. – Vol. 326. – P. 137–140.
5. Genographic Consortium. Ancient DNA reveals key stage in the formation of central

- European mitochondrial genetic diversity / G. Brandt [et al.] // *Science*. – 2013. – Vol. 342. – P. 257–261.
6. Genographic Consortium. Neolithic mitochondrial haplogroup H genomes and the genetic origins of Europeans / P. Brotherton [et al.] // *Nat. Commun.* – 2013. – Vol. 4. – P. 1764.
7. DNA in ancient bone – where is it located and how should we extract it? / P.F. Campos [et al.] // *Ann. Anat.* – 2012. – Vol. 194. – P. 7–16.
8. Cann, R.L. Mitochondrial DNA and human Evolution / R.L. Cann, M. Stoneking, A.C. Wilson // *Nature*. – 1987. – Vol. 325. – P. 31–36.
9. Cooper, A. Ancient DNA: do it right or not at all / A. Cooper, H. Poinar // *Science*. – 2000. – Vol. 289. – P. 1139.
10. Currat M., Excoffier L. Modern humans did not admix with Neanderthals during their range expansion into Europe / M. Currat, L. Excoffier // *PLoS Biol.* – 2004. – Vol. 2. – № 12. – P. 2264–2274.
11. Genographic Consortium. Ancient DNA reveals prehistoric gene flow from Siberia in the complex human population history of North East Europe / C. der Sarkissian // *PLoS Genet.* – 2013. – Vol. 9: e1003296.
12. Testing for ancient admixture between closely related populations / E.Y. Durand [et al.] // *Mol. Biol. Evol.* – 2011. – Vol. 28. – P. 2239–2252.
13. Forster, P. Ice Ages and the mitochondrial DNA chronology of human dispersals: a review / P. Forster // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* – 2004. – Vol. 359. – P. 255–264.
14. A revised timescale for human evolution based on ancient mitochondrial genomes / Q. Fu [et al.] // *Curr. Biol.* – 2013. – Vol. 8. – P. 553–559.
15. Genome Sequence of a 45,000-year-old modern human from western Siberia / Q. Fu [et al.] // *Nature*. – 2014. – Vol. 514. – P. 445–449.
16. Giardina, E. Past, present and future of forensic DNA typing / E. Giardina, A. Spinella, G. Novelli // *Nanomedicine (Lond.)*. – 2011. – Vol. 6. – P. 256–270.
17. DNA from pre-Clovis human coprolites in Oregon, North America / M.T. Gilbert [et al.] // *Science*. – 2008. – Vol. 320. – P. 786–789.
18. Tracing the origin of the east-west population admixture in the Altai region (Central Asia) / M. Gonzalez-Ruiz [et al.] // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7: e48904.
19. A complete Neanderthal mitochondrial genome sequence determined by high-throughput sequencing / R.E. Green [et al.] // *Cell*. – 2008. – Vol. 134. – P. 416–426.
20. A draft sequence of the Neanderthal genome / R.E. Green [et al.] // *Science*. – 2010. – Vol. 328. – P. 710–722.
21. Ancient DNA from the first European farmers in 7500-Year-Old Neolithic sites / W. Haak [et al.] // *Science*. – 2005. – Vol. 305. – P. 1016–1018.
22. The retrieval of ancient human DNA sequences / O. Handt [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 1996. – Vol. 59. – P. 368–376.
23. Molecular typing of Neolithic human bones / C. Hanni [et al.] // *J. Archaeol. Sci.* – 1995. – Vol. 22. – P. 649–658.
24. Statistical evidence for miscoding lesions in ancient DNA templates / A.J. Hansen [et al.] // *Mol. Biol. Evol.* – 2001. – Vol. 18. – P. 262–265.
25. Hauswirth, C.D. Inter- and intrapopulation studies of ancient humans / C.D. Hauswirth, D.J. Dickel, M.A. Rowold // *Experientia*. – 1992. – Vol. 50 – P. 585–591.
26. DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family / R. Higuchi [et al.] // *Nature*. – 1984. – Vol. 312. – P. 282–284.
27. DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA / M. Hofreiter [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2001. – Vol. 29. – P. 4793–4799.
28. DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues / M. Hoss [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 1996. – Vol. 24. – P. 1304–1307.
29. Altitude adaptation in Tibetans caused by introgression of Denisovan-like DNA / E. Huerta-Sanchez [et al.] // *Nature*. – 2014. – Vol. 512. – P. 194–197.
30. A comparative study of ancient sedimentary DNA, pollen and microfossils from permafrost sediments of northern Siberia reveals long-term vegetational stability / T. Jorgensen [et al.] // *Mol. Ecol.* – 2012. – Vol. 21. – P. 1989–2003.
31. Kaestle, F.A. Ancient DNA in anthropology: methods, applications, and ethics / F.A. Kaestle, K.A. Horsburgh // *Am. J. Phys. Anthropol.* – 2002. – Vol. 119. – N. S35. – P. 92–130.
32. New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree / T.M. Karafet [et al.] // *Genome Res.* – 2008. – Vol. 18. – P. 830–838.

33. Keyser-Tracqui, C. Nuclear and mitochondrial DNA analysis of a 2,000 year-old necropolis in the Egyin Gol Valley of Mongolia / C. Keyser-Tracqui, E. Crubezy, B. Ludes // *Am. J. Hum. Genet.* – 2003. – Vol. 73. – P. 247–260.
34. Ancient DNA provides new insights into the history of south Siberian Kurgan people / C. Keyser [et al.] // *Hum. Genet.* – 2009. – Vol. 126. – P. 395–410.
35. Kirsanow, K. Ancient human DNA / K. Kirsanow, J. Burger // *Ann. Anat.* – 2012. – Vol. 194. – P. 121–132.
36. Neandertals in central Asia and Siberia / J. Krause [et al.] // *Nature.* – 2007. – Vol. 449. – P. 902–904.
37. The complete mitochondrial DNA genome of an unknown hominin from southern Siberia / J. Krause [et al.] // *Nature.* – 2010a. – Vol. 464. – P. 894–897.
38. A Complete mtDNA Genome of an Early Modern Human from Kostenki, Russia / J. Krause [et al.] // *Curr. Biol.* – 2010b. – Vol. 20. – P. 1–6.
39. A view of Neanderthal genetic diversity / M. Krings [et al.] // *Nature Genet.* – 2000. – Vol. 26. – P. 144–146.
40. Neanderthal DNA sequences and the origin of modern humans / M. Krings [et al.] // *Cell.* – 1997. – Vol. 90. – P. 19–30.
41. Unravelling migrations in the steppe: mitochondrial DNA sequences from ancient Central Asians / C. Lalueza-Fox [et al.] // *Proc. Biol. Sci.* – 2004. – Vol. 271. – P. 941–947.
42. Ancient human genomes suggests three ancestral populations for present-day Europeans / I. Lazaridis [et al.] // *Nature.* – 2014. – Vol. 513. – P. 409–413.
43. Ancient DNA reveals lack of continuity between Neolithic Hunter-Gatherers and contemporary Scandinavians / H. Malmstrom [et al.] // *Curr. Biol.* – 2009. – Vol. 19. – P. 1758–1762.
44. Maricic, T. Multiplexed DNA sequence capture of mitochondrial genomes using PCR products / T. Maricic, M. Whitten, S. Paabo // *PLoS ONE.* – 2010. – Vol. 5: e14004.
45. Mendez, F.L. Neandertal origin of genetic variation at the cluster of OAS immunity genes / F.L. Mendez, J.C. Watkins, M.F. Hammer // *Mol. Biol. Evol.* – 2013. – Vol. 30. – P. 798–801.
46. A high-coverage genome sequence from an archaic Denisovan individual / M. Meyer [et al.] // *Science.* – 2012. – Vol. 338. – P. 222–226.
47. A mitochondrial genome sequence of a hominin from Sima de los Huesos / M. Meyer [et al.] // *Science.* – 2013. – Vol. 342. – P. 403–406.
48. Human migrations in the southern region of the West Siberian Plain during the Bronze Age: Archaeological, palaeogenetic and anthropological data / V.I. Molodin [et al.] // *Population Dynamics in Pre- and Early History: New Approaches Using Stable Isotopes and Genetics.* Berlin, 2012. – P. 95–113.
49. DNA from keratinous tissue. Part II: feather / M.E. Olsen [et al.] // *Ann. Anat.* – 2012. – Vol. 194. – P. 31–35.
50. A genetic study of 2,000-year-old human remains from Japan using mitochondrial DNA sequences / H. Oota [et al.] // *Am. J. Phys. Anthropol.* – 1995. – Vol. 98. – P. 133–145.
51. Oskam, C.L. DNA extraction from fossil eggshell / C.L. Oskam, M. Bunce // *Methods. Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 840. – P. 65–70.
52. Molecular analysis of Neanderthal DNA from the northern Caucasus / I.V. Ovchinnikov [et al.] // *Nature.* – 2000. – Vol. 404. – P. 490–493.
53. Paabo S. Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA / S. Paabo // *Nature.* – 1985. – Vol. 314. – P. 644–645.
54. Paabo, S. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification / S. Paabo // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1989. – Vol. 86. – P. 1939–1943.
55. Genetic Analyses from Ancient DNA / S. Paabo [et al.] // *Annu. Rev. Genet.* – 2004. – Vol. 38. – P. 645–679.
56. Mitochondrial DNA studies of the Pazyryk people (4th to 3rd centuries BC) from northwestern Mongolia / A.S. Pilipenko [et al.] // *Archaeol. Anthropol. Sci.* – 2010. – Vol. 2. – N. 4. – P. 231–236.
57. Poinar, H.N. DNA from an extinct plant / H.N. Poinar, G.O. Poinar, R.J. Cano // *Nature.* – 1993. – Vol. 363. – P. 677.
58. The complete genome sequence of a Neanderthal from the Altai Mountains / K. Prufer [et al.] // *Nature.* – 2014. – Vol. 505. – P. 43–49.
59. Upper Paleolithic Siberian genome reveals dual ancestry of Native Americans / M. Raghavan [et al.] // *Nature.* – 2014. – Vol. 505. – P. 87–91.
60. Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia / D. Reich [et al.] // *Nature.* – 2010. – Vol. 468. – P. 1053–1060.

61. Denisova admixture and the first modern human dispersals into Southeast Asia and Oceania / D. Reich [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2011. – Vol. 89. – P. 516–528.
62. Richards, M.B. Authenticating DNA extracted from ancient skeletal remains / M.B. Richards, B.C. Sykes, R.M. Hedges // *J. Archaeol. Sci.* – 1995. – Vol. 22. – P. 291–299.
63. Stoneking, M. Mitochondrial DNA and human evolution / M. Stoneking // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 1994. – Vol. 26. – P. 251–259.
64. Stoneking, M. Ancient DNA: how do you know when you have it and what can you do with it? / M. Stoneking // *Am. J. Hum. Genet.* – 1995. – Vol. 57. – P. 1259–1262.
65. Stringer, C. Modern human origins: progress and prospects / C. Stringer // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* – 2002. – Vol. 7. – P. 563–579.
66. Stringer, C.B. Genetic and fossil evidence for the origin of modern humans / C.B. Stringer, P. Andrews // *Science.* – 1988. – Vol. 239. – P. 1263–1268.
67. DNA phylogeny of the extinct marsupial wolf / R.H. Thomas [et al.] // *Nature.* – 1989. – Vol. 340. – P. 465–467.
68. Thorne, A.G. The multiregional evolution of humans / A.G. Thorne, M.H. Wolpoff // *Sci. Am.* – 1992. – Vol. 266. – N 4. – P. 76–79.
69. Underhill, P.A. Use of Y-chromosome and mitochondrial DNA population structure in tracing human migrations / P.A. Underhill, T. Kivisild // *Annu. Rev. Genet.* – 2007. – Vol. 41. – P. 539–564.
70. Van Oven, M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation / M. van Oven, M. Kayser // *Human Mutation.* – 2009. – Vol. 30. – P. E386–E394.
71. Wallace, D.C. Mitochondrial DNA variation in human evolution, degenerative disease and aging / D.C. Wallace // *Am. J. Hum. Genet.* – 1995. – Vol. 57. – P. 201–223.
72. Genetic data suggests that the Jinggouzi people are associated with the Donghu, an ancient nomadic group of North China / H. Wang // *Hum. Biol.* – 2012. – Vol. 84. – P. 365–378.
73. Willerslev, E. Ancient DNA / E. Willerslev, A. Cooper // *Proc. Biol. Sci.* – 2005. – Vol. 272. – P. 3–16.
74. Wolpoff, M.H. Multiregional, not multiple origins / M.H. Wolpoff, J. Hawks, R. Caspari // *Am. J. Phys. Anthropol.* – 2000. – Vol. 112. – P. 129–136.
75. Modern human ancestry at the peripheries: a test of the replacement theory / M.H. Wolpoff [et al.] // *Science.* – 2001. – Vol. 291. – P. 293–297.
76. Ancient DNA evidence reveals that the Y-chromosome haplogroup Q1a1 admixed into the Han Chinese 3000 years ago / Y.B. Zhao [et al.] // *Am. J. Hum. Biol.* – 2014. doi: 10.1002/ajhb.22604.

Дата поступления статьи 1 октября 2014 г.

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
ГНУ «ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И ЦИТОЛОГИИ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК
БЕЛАРУСИ»

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ КООРДИНАЦИОННЫЙ ЦЕНТР
ПО ВОПРОСАМ ДОСТУПА К ГЕНЕТИЧЕСКИМ
РЕСУРСАМ И СОВМЕСТНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
ВЫГОД (НКЦГР)**

Контактная информация:
ул. Академическая, 27, каб. 208
Минск, 220072
Тел.: +375 17 284-0297
Факс: +375 17 284-1917
E-mail: belarusnpabs@gmail.com

27 Akademicheskaya street,
Minsk, Belarus 220072
Phone: +375 17 284-0297
Fax: +375 17 284-1917
E-mail: belarusnpabs@gmail.com

НАГОЙСКИЙ ПРОТОКОЛ – МЕЖДУНАРОДНЫЙ МЕХАНИЗМ РЕГУЛИРОВАНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ

обзорная статья

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

²Министерство природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь
Республика Беларусь, 220048, г. Минск, ул. Коллекторная, 10

Проблемы сокращения разнообразия экологических систем, видов и, соответственно, сужения разнообразия генетических ресурсов – основные вопросы, обсуждаемые странами, являющихся сторонами Конвенции о биологическом разнообразии и протоколов к ней. Ни у кого не вызывает сомнения тот факт, что дальнейшее сокращение биологического разнообразия может привести к дестабилизации биоты, утрате целостности биосферы и ее способности поддерживать важнейшие качества среды, необходимые для жизни. Сохранение разнообразия живых систем на Земле – основное условие для выживания человека и устойчивого развития цивилизации.

Деятельность стран – сторон Конвенции о биологическом разнообразии (далее – КБР), подписанной 5.06.1992 г. в Рио-де-Жанейро, направлена на сохранение биологического разнообразия, устойчивое использование его компонентов и совместное получение на справедливой и равной основе выгод от использования генетических ресурсов, предоставление доступа к генетическим ресурсам и надлежащей передачи соответствующих технологий с учетом всех прав на такие ресурсы и технологии, в том числе путем должного финансирования [1]. Указанные цели реализуются через Протоколы к КБР, такие как: Картахенский протокол по биобезопасности и Нагойский протокол регулирования доступа к генетическим ресурсам и совместного использования на справедливой и равной основе выгод от их применения (далее – Нагойский протокол).

Основной принцип КБР заключается в том, что государства имеют суверенное право разрабатывать собственные ресурсы

согласно своей политики в области окружающей среды. Прежняя доктрина, которая определяла, что генетические ресурсы, независимо от их происхождения, являются общим достоянием человечества, уже не состоятельна. Нагойский протокол, несомненно, служит основанием для борьбы с так называемым биопиратством, от которого прежде всего страдают развивающиеся страны, чьи национальные интересы ущемляются иностранными компаниями, производящими и патентующими уникальные продукты, произведенные с использованием генетических ресурсов этих стран [2].

Нагойский протокол применяется к генетическим ресурсам и к выгодам, полученным от использования как самих ресурсов, так и традиционных знаний, связанных с генетическими ресурсами. В нем заложена основа для обеспечения более четкой правовой определенности и прозрачности при взаимодействии стран, поставляющих генетические ресурсы (далее – Поставщик), включая биотехнологии, разработанные для их эффективного использования, и стран, использующих эти ресурсы (далее – Пользователь), как при коммерческих взаимоотношениях, так и при обмене генетическими ресурсами для научно-исследовательских целей. Важнейшим нововведением Протокола является установление конкретных правил, обеспечивающих поддержку национального законодательства по защите прав Поставщиков на прибыль, которую получает Пользователь от коммерческой деятельности с использованием полученных генетических ресурсов - это право должно быть учтено при составлении договоров и закреплено взаимосогласованными условиями в рамках соблюдения Нагойского протокола.

Согласно определению понятия «использование генетических ресурсов», приведенному в статье 2 Нагойского протокола, Пользователями генетических ресурсов выступают ботанические сады, предприятия и организации фармакологической, сельскохозяйственной и косметической промышленности, коллекционеры объектов живой природы (как юридические лица, например, научно-исследовательские институты и созданные на их базе банки ДНК, клеток и тканей растений и животных, коллекции микроорганизмов, так и физические лица, например, собиратели растений и животных, обладающих ценными фармацевтическими и/или хозяйственными свойствами), особое внимание при этом уделяется объектам растительного и животного мира, внесенным в Красную Книгу.

Пользователям необходим доступ к генетическим ресурсам в разных целях: от проведения фундаментальных исследований до создания новых продуктов. Например, в области фармацевтических препаратов десять стран владеют 90 процентами патентов, связанных с биологическим разнообразием морской среды. Вместе с тем, международные эксперты, участвовавшие в разработке Нагойского протокола, отмечали, что в настоящее время отсутствуют полные данные о количестве соглашений, а также о характере, объеме и устойчивости выгод от применения генетических ресурсов. В этой связи была поставлена задача исправления данной ситуации через Механизм посредничества путем создания банка данных о генетических ресурсах, к которым страны - стороны Нагойского протокола разрешают доступ с целью их использования в рамках соблюдения положений протокола, в которых содержатся необходимые требования, создающие более предсказуемые условия доступа и способствующие обеспечению гарантированного совместного использования выгод, особенно в случаях, когда генетические ресурсы вывозятся за пределы территории стороны-поставщика.

Республика Беларусь является стороной перечисленных выше важных международных соглашений (Конвенции о биоло-

гическом разнообразии – с 8.09.1993 г., Картахенского протокола – с 11.09.2003 г., Нагойского протокола – с 12.10.2014 г.). В стране созданы необходимые условия для их эффективного исполнения, как на национальном (на базе Института генетики и цитологии НАН Беларуси с 1998 г. эффективно функционирует Национальный координационный центр биобезопасности, а с 24.11.2014 г. начал работу Национальный координационный центр по вопросам доступа к генетическим ресурсам и совместного использования выгод), так и на международном уровнях (национальные координационные центры поддерживают постоянную связь с Секретариатом Конвенции о биологическом разнообразии, национальные координаторы КБР и протоколов к ней входят в состав комиссий и комитетов при Секретариате КБР).

Беларусь обладает значительными генетическими ресурсами растительного мира и возможностями для обеспечения доступа и получения выгод от их использования. Ценнейший генетический материал (более 33 тыс. образцов) хранится в коллекциях 13 научных учреждений НАН Беларуси [5], к которым может быть обеспечен доступ, как в рамках обмена материалом, так и для получения совместных выгод от их использования, в том числе коммерческого.

В республике существует развитая система ботанических коллекций (в государственный реестр включено 40 ботанических коллекций в качестве Национального достояния Республики Беларусь). Для исследователей одним из наиболее востребованных ресурсов являются редкие и находящиеся под угрозой исчезновения дикорастущие растения, включенные в Красную книгу Республики Беларусь (таких видов в стране насчитывается 35). Лекарственные растения составляют около 40% всего ассортимента лекарственных средств. [3]

Экспорт растительного сырья и фитопрепаратов, полученных на их основе, – одно из бурно развивающихся направлений развития экономики сопредельных государств. Мировой рынок фитопрепаратов оценивается более чем в 50 млрд. долларов США. Беларусь также имеет значительный рас-

тительный ресурсный потенциал не только для производства фитопрепаратов, но и экспорта пряно-ароматических растений, что может, при обеспечении соответствующего доступа, принести значительные выгоды от их использования. По данным государственного кадастра растительного мира Республики Беларусь общий биологический запас лекарственных и пищевых растений на территории республики составляет 943061,5 тонн, грибов – 39201,0 тонн. Ориентировочная стоимость сырья, которое можно заготавливать ежегодно, составляет 300-400 млн. долларов США. На основе этого сырья республика ежегодно может дополнительно выпускать продукцию на сумму 1-2 миллиардов долларов США [3].

Генетическое разнообразие животного мира Беларуси представлено 467 видами позвоночных и более чем 30 тысячами видов беспозвоночных животных различных групп. В настоящее время эксплуатация этих ресурсов идет по следующим направлениям: (а) прямое использование диких популяций: фармацевтика, получение и производство трофеев, употребление в пищу (виноградная улитка, зеленые лягушки), и в условиях зоокультуры (выращивание ракообразных, разведение проходных рыб, вермифтехнология); (б) сохранение генофонда аборигенных видов животных для восстановления и поддержания их диких популяций в других странах; (в) борьба с инвазивными видами.

Однако в стране имеется большой потенциал для расширения экспортных возможностей и получения прямых выгод за счет таких видов деятельности, как: 1) экспорт объектов животного мира (зубр, волк и др.) для поддержания генетического фонда диких популяций аборигенных видов (заповедники, национальные парки); б) расширение возможностей по хранению образцов генетического материала для их последующей коммерческой реализации или получения ценных образцов путем обмена [4].

В декабре 2011 года на базе Института генетики и цитологии НАН Беларуси создан Республиканский центр геномных биотехнологий, в котором проводится генетическая паспортизация растений и гибридов

сельскохозяйственных культур с целью повышения эффективности селекции и семеноводства, сельскохозяйственных животных – для поддержания чистоты породы, а ДНК-типирование микроорганизмов – для санитарно-гигиенической сертификации и патентной защиты. Особое место занимают научно-практические разработки по генетической паспортизации человека по разным группам генов. Создан Республиканский Банк ДНК человека, животных, растений и микроорганизмов (2013 г.). Выход Республиканского центра геномных биотехнологий на проектную мощность сможет решить проблему коммерциализации геномных разработок и заложить основу для формирования отечественного рынка геномных биотехнологий, обеспечения около 75% потребностей страны в разработках такого типа. Выход страны на международный рынок генетических ресурсов с инновационными биотехнологиями, созданными в стране, и соответствующее получение выгод от их применения станет возможным в рамках Нагойского протокола.

Каждые два года проходят конференции стран – сторон Конвенции и протоколов к ней для оценки эффективности их действия, обсуждения вопросов по выполнению сторонами договорных обязательств, рассмотрению возможных проблем по соблюдению и разработки мер по их преодолению, а также для принятия решений, направленных на дальнейшее совершенствование правовых механизмов применения указанных договоров.

В 2014 г. 3 конференции стран-сторон Конвенции, Картахенского и Нагойского протоколов проходили последовательно в г. Пхёнчханг, Республика Корея, с 29 сентября по 17 октября 2014 г. по приглашению правительства Республики Кореи. Республику Беларусь на этих мероприятиях представляли начальник управления биологического и ландшафтного разнообразия Министерства природных ресурсов и охраны окружающей среды, национальный координатор Конвенции о биологическом разнообразии Наталья Владимировна Минченко (глава делегации) и руководитель Национального координационного центра по вопросам до-

ступа к генетическим ресурсам и совместного использования выгод при Институте генетики и цитологии НАН Беларуси, национальный координатор Механизма посредничества Картаженского и Нагойского протоколов Елена Николаевна Макеева (член делегации).

Нагойский протокол вступил в силу 12 октября 2014 г. 1-я Конференция Сторон Нагойского протокола проходила с 13 по 17.10.2014 г. в рамках Конференции, действующей как совещание стран-сторон Конвенции о биологическом разнообразии. На ней были приняты основные решения, которые обеспечивают функционирование Нагойского протокола: регулирующие процедуры проведения Конференции, выступающей в качестве совещания Сторон; утвержден формат национальных докладов по выполнению протокола; приняты решения о процедурах и организационных механизмах стимулирования соблюдения его положений и рассмотрения случаев несоблюдения; учрежден Комитет по соблюдению Нагойского протокола в количестве 15 человек (по 3 представителя от каждой региональной группы стран). Республика Беларусь активно участвует во всех мероприятиях, которые проводит Секретариат в рамках Конвенции о биологическом разнообразии и протоколов к ней. В результате выборов в организационные структуры конвенции и протоколов к ней Минченко Н.В. была избрана одним из членов бюро Конвенции о биологическом разнообразии, а Макеева Е.Н. – членом Комитета по соблюдению Нагойского протокола при Секретариате КБР.

Отмечая особую значимость разработки действенного многостороннего механизма совместного использования выгод, конференция сторон утвердила решение, согласно которому правительствам стран-сторон КБР и протоколов к ней, правительствам других стран, международным организациям, коренным и местным общинам и соответствующим субъектам деятельности предлагается предоставить исполнителю Секретарю КБР информацию о ситуациях, которые подтверждают необходимость создания глобального многостороннего меха-

низма совместного использования выгод, основные принципы которого изложены в статье 10 Нагойского протокола, так как такой механизм не отражен в двустороннем подходе, и о возможных условиях его функционирования. Исполнительному секретарю КБР поручено подготовить анализ такой информации, а также определить потенциальную значимость текущей работы по изучению других процессов, включающих тематические исследования по использованию генетических ресурсов *in-situ* и *ex-situ*, исследованию трансграничных ситуаций использования генетических ресурсов и традиционных знаний, связанных с этими ресурсами. Результаты анализа должны быть представлены для обсуждения на втором совещании Конференции Сторон, выступающей в качестве Совещания Сторон Нагойского протокола.

Таким образом, Нагойский протокол вступил в силу, на Первой конференции стран-сторон протокола приняты основополагающие решения для обеспечения его эффективности в области защиты прав Поставщиков генетических ресурсов на долю прибыли, получаемой их Пользователями, что, в свою очередь, создает стимулы к сохранению биологического разнообразия, устойчивому использованию его компонентов и дальнейшему расширению вклада биологического разнообразия в устойчивое социально-экономическое развитие стран для повышения благосостояния людей.

Список использованных источников

1. Конвенция о биологическом разнообразии. – Канада, 2011.
2. Серова М.А. Охрана генетических ресурсов: менять ли патентное законодательство? // Российская библиотека интеллектуальной собственности: Электронный ресурс: <http://rbis.su/article.php?article=307>
3. Масловский О.М. Генетические ресурсы растительного мира Республики Беларусь // Национальный координационный центр биобезопасности. Электронный ресурс: <http://biosafety.org.by/sites/default/files/downloads/Nagoya%20project/maslovsky-23-12-2013.pdf>

4. Новицкий Р.В. Генетические ресурсы животного мира Республики Беларусь // Национальный координационный центр биобезопасности. Электронный ресурс: <http://biosafety.org.by/sites/default/files/downloads/Nagoya%20project/novitsky-23-12-2013.pdf>
5. Привалов Ф.И., Гриб С.И., Матыс И.С. Генетический банк хозяйственно полезных растений в Республике Беларусь. // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2012. – Т. 16, №3. – С. 636 – 642.

Дата поступления статьи 25 ноября 2014 г.

ПОЛОЖЕНИЕ

о Национальном координационном центре по вопросам доступа к генетическим ресурсам и совместного использования выгод

ГЛАВА 1 ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. Настоящее Положение определяет цели, задачи, функции и порядок деятельности Национального координационного центра по вопросам доступа к генетическим ресурсам и совместного использования выгод (далее – Центр).

2. Центр является структурным подразделением государственного научного учреждения «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси» (далее – Институт).

3. Центр возглавляет руководитель, который назначается на должность и освобождается от занимаемой должности на основании приказа директора Института.

4. Структура, штатная численность, смета расходов и программа деятельности Центра утверждается директором Института.

5. Работники Центра назначаются на должность и освобождаются от занимаемой должности на основании приказа директора Института.

6. Финансирование Центра производится из средств, предоставляемых Институту на выполнение функций Центра и контрольного пункта мониторинга использования генетических ресурсов, и осуществляется в пределах средств республиканского бюджета на научную и научно-техническую деятельность, выделяемых на обеспечение уставной деятельности Национальной академии наук Беларуси.

7. Центр осуществляет свою деятельность в соответствии с:

Указом Президента Республики Беларусь от 22 мая 2014 г. № 235 «О присоединении к международному договору»;

Нагойским протоколом регулирования доступа к генетическим ресурсам и совместного использования на справедливой и равной основе выгод от их применения к Конвенции о биологическом разнообразии, г. Нагоя, Япония, 2010 (далее – Нагойский протокол);

Постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 1 октября 2014 г. № 933 «О создании Национального координационного центра по вопросам доступа к генетическим ресурсам и совместного использования выгод»;

иными нормативными правовыми актами Республики Беларусь.

ГЛАВА 2 ЗАДАЧИ И ФУНКЦИИ ЦЕНТРА

8. Задачи Центра:

сбор, анализ и систематизация информации о законодательстве в области регулирования

доступа к генетическим ресурсам Республики Беларусь и совместного использования выгод от их применения;

сбор, систематизация и анализ информации, создание национального банка данных о генетических ресурсах Республики Беларусь, к которым может быть обеспечен доступ и совместное использование, включающее совместное использование выгод;

поддержание постоянной связи с Секретариатом Конвенции о биологическом разнообразии и участие в Механизме посредничества по обмену информацией о генетических ресурсах, о законодательном регулировании доступа к ним и совместного использования выгод;

предоставление информации заявителям (юридическим и физическим лицам), желающим получить доступ к генетическим ресурсам Республики Беларусь, о порядке получения предварительного обоснованного согласия и заключения взаимосогласованных условий, включающих совместное использование выгод;

предоставление информации заявителям (юридическим и физическим лицам), желающим получить доступ к традиционным знаниям, связанным с генетическими ресурсами, и информацию о порядке получения предварительного обоснованного согласия и заключения взаимосогласованных условий, включающих совместное использование выгод;

предоставление информации о компетентных национальных органах, соответствующих субъектах деятельности, связанной с сохранением и использованием генетических ресурсов, заинтересованным республиканским органам государственного управления, средствам массовой информации;

организация научной и экономической экспертизы проектов, соглашений, договоров о получении доступа к генетическим ресурсам Республики Беларусь и условиях их использования, включающих совместное использование выгод;

обмен информацией с координационными центрами и с международными организациями по вопросам доступа к генетическим ресурсам других стран;

оказание консультативных услуг государственным органам и иным организациям в разработке проектов актов законодательства, касающихся регулирования доступа к генетическим ресурсам Республики Беларусь и совместного использования выгод от их применения;

оказание консультативных услуг государственным органам и иным организациям в подготовке предложений по заключению двусторонних и многосторонних соглашений, в разработке международных соглашений о доступе к генетическим ресурсам и условиях их использования, включающих совместное использование выгод.

9. Функции Центра:

координационно-информационная деятельность в области обеспечения доступа к генетическим ресурсам и условий их использования, включающих совместное использование выгод;

оказание информационно-консультативной помощи государственным органам и иным организациям, деятельность которых подпадает под действие Нагойского протокола;

участие в разработке и совершенствовании нормативных правовых актов, регулирующих доступ к генетическим ресурсам и совместное использование выгод от их применения;

осуществление деятельности, способствующей повышению информированности государственных служащих, специалистов в области науки, сельского и лесного хозяйства, таможенных служб, заповедного дела, рыбохозяйства, юристов и работников образования, широких слоев населения о целях и задачах Нагойского протокола;

проведение научно-практических республиканских и международных конференций по проблемам регулирования доступа к генетическим ресурсам и совместного использования выгод от их применения в рамках Нагойского протокола;

организация научно-экономической экспертизы проектов, соглашений, договоров о получении доступа к генетическим ресурсам Республики Беларусь и условий их использования, включающих совместное использование выгод, после получения заявителем предварительного обоснованного согласия;

разработка и издание информационно-практических и справочных пособий по Нагойскому протоколу для специалистов научных, научно-производственных, государственных и ведомственных организаций, а также для широкого круга заинтересованных лиц;

осуществление постоянной связи с Секретариатом Конвенции о биологическом разнообразии и участие в Механизме посредничества по обмену информацией о генетических ресурсах, о законодательном регулировании доступа к ним и совместного использования выгод от их применения;

поддержание и развитие национального потенциала для взаимодействия с Механизмом посредничества по Нагойскому протоколу;

развитие международного сотрудничества в рамках Нагойского протокола во всех форматах, способствующих его успешному выполнению в Республике Беларусь и в других странах;

подготовка Национальных докладов о выполнении Республикой Беларусь обязательств по Нагойскому протоколу;

разработка и поддержка информационно-справочного веб-сайта по Нагойскому протоколу и включение его в систему обмена информацией с интернет-порталом Механизма посредничества Конвенции о биологическом разнообразии;

подготовка и опубликование нормативных правовых актов Республики Беларусь, а также информационных материалов по вопросам выполнения Нагойского протокола в Республике Беларусь на интернет-портале Механизма посредничества по Нагойскому протоколу к Конвенции о биологическом разнообразии.

ГЛАВА 3 ПРАВА ЦЕНТРА

10. Для осуществления своей деятельности Центр наделяется следующими правами:

10.1. запрашивать и получать в установленном порядке от государственных органов, юридических и физических лиц необходимые документы и информацию;

10.2. обращаться в государственные органы с предложениями по совершенствованию законодательства и повышению эффективности административных и других мер, определенных для выполнения обязательств Республики Беларусь по Нагойскому протоколу;

10.3. устанавливать взаимоотношения с зарубежными правительственными и неправительственными организациями в области обмена информацией, консультаций по законодательному регулированию доступа к генетическим ресурсам и распределению выгод от их применения;

10.4. устанавливать взаимоотношения с зарубежными правительственными и неправительственными организациями для участия в международных семинарах, экспертных рабочих группах и советах по Нагойскому протоколу и организации аналогичных мероприятий в Беларуси;

10.5. обращаться в Министерство природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь с предложениями о назначении национальных координаторов по Нагойскому протоколу и для участия в Механизме посредничества по доступу к генетическим ресурсам и распределению выгод;

10.6. обращаться в Министерство природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь для информирования о случаях несоблюдения Нагойского протокола на территории Республики Беларусь;

10.7. обращаться в Министерство природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь с предложениями о формате распространения среди заинтересованных юридических и физических лиц положительного опыта обеспечения доступа к генетическим ресурсам и взаимовыгодного их использования в соответствии с положениями Нагойского протокола.

ГЛАВА 4 ПОЛНОМОЧИЯ РУКОВОДИТЕЛЯ ЦЕНТРА

11. Руководитель Центра:

представляет на утверждение директора Института смету расходов Центра;
отвечает за разработку и исполнение научно-практических планов деятельности Центра;
осуществляет иные полномочия, связанные с непосредственным руководством Центром;
способствует достижению целей в области эффективного планирования, обеспечения и улучшения качества осуществляемой деятельности;

соблюдает требования документов действующей системы менеджмента качества (СМК) по направлению деятельности Центра;

вносит руководству Института предложения о поощрении или наложении дисциплинарного взыскания на работников Центра;

обеспечивает соблюдение работниками Центра требований по защите информации, составляющей государственную и коммерческую тайну, требований охраны труда, в том числе пожарной безопасности, правил внутреннего трудового распорядка, локальных нормативных правовых актов, касающихся деятельности Центра.

ГЛАВА 5 ВЗАИМООТНОШЕНИЯ. СВЯЗИ

12. В своей деятельности Центр взаимодействует по вопросам:

12.1. анализа и отчетности – с заместителем директора по научной работе, заместителем директора по научной и инновационной работе, ученым секретарем Института, руководителями подразделений Института, а также с Отделением биологических наук Национальной академии наук Беларуси, отделом научно-организационной и информационно-аналитической работы аппарата Национальной академии наук Беларуси;

12.2. заключения контрактов и договоров по научно-техническим программам, инновационным проектам, международным соглашениям, грантам и проектам международной технической помощи – с заместителем директора Института по научной и инновационной работе, Министерством природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь, другими министерствами и ведомствами, подразделениями Института, управлением международного сотрудничества и планово-финансовым управлением аппарата Национальной академии наук Беларуси, организациями Национальной академии наук Беларуси, юридическими лицами и иными организациями разных форм собственности, индивидуальными предпринимателями;

12.3. международного научно-технического сотрудничества в пределах компетенции Центра – с заместителями директора по научной и научной и инновационной работе, бухгалтерией Института, планово-финансовым управлением и управлением международного сотрудничества аппарата Национальной академии наук Беларуси;

12.4. отбора, формирования и реализации инновационных проектов и проектов международной технической помощи – с заместителем директора по научной работе, руководителями подразделений Института, инновационными фондами, Министерством природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь, другими министерствами и ведомствами, юридическими лицами и иными организациями разных форм собственности, индивидуальными предпринимателями;

12.5. по вопросам выполнения обязательств, принятых Республикой Беларусь по Нагойскому протоколу – с Министерством природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь, с органом, ответственным за выполнение Нагойского протокола в Республике Беларусь, определенным Указом Президента Республики Беларусь от 22 мая 2014 г. № 235 «О присоединении к международному договору».

ГЛАВА 6 ОТВЕТСТВЕННОСТЬ ЦЕНТРА

13. Руководитель Центра несет персональную ответственность за выполнение функций и обязанностей, установленных настоящим Положением.

14. Работники Центра несут ответственность за:

своевременное и качественное выполнение возложенных на них должностных обязанностей, а также разовых поручений и заданий;

соблюдение правил внутреннего распорядка Института, техники безопасности, противопожарных правил.

ПОЛОЖЕНИЕ

о контрольном пункте мониторинга
и использования генетических ресурсов

ГЛАВА 1

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. Контрольный пункт мониторинга использования генетических ресурсов (далее – Контрольный пункт) создается в соответствии со статьей 17 Нагойского протокола регулирования доступа к генетическим ресурсам и совместного использования на справедливой и равной основе выгод от их применения к Конвенции о биологическом разнообразии (далее – Нагойский протокол).

2. Общее руководство Контрольным пунктом осуществляет директор государственного научного учреждения «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси» (далее – Институт).

3. Задачи и функции Контрольного пункта реализует Национальный координационный центр по вопросам доступа к генетическим ресурсам и совместного использования выгод (далее – Центр) по приказу директора Института.

4. Контрольный пункт осуществляет свою деятельность в соответствии с:

Указом Президента Республики Беларусь от 22 мая 2014 г. № 235 «О присоединении к международному договору»;

статьей 17 Нагойского протокола;

постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 1 октября 2014 г. № 933 «О создании Национального координационного центра по вопросам доступа к генетическим ресурсам и совместного использования выгод»;

иными нормативными правовыми актами Республики Беларусь.

ГЛАВА 2

ЗАДАЧИ И ФУНКЦИИ КОНТРОЛЬНОГО ПУНКТА

5. Задачи Контрольного пункта:

5.1. Оказание поддержки соблюдению Нагойского протокола в Республике Беларусь путем принятия соответствующих мер, указанных ниже, для мониторинга и повышения прозрачности использования генетических ресурсов путем принятия соответствующих мер. Такие меры включают в себя:

получение или сбор информации, связанной с предварительным обоснованным согласием, источником генетического ресурса, заключением взаимосогласованных условий и (или) использованием генетических ресурсов;

предъявление требований пользователям генетических ресурсов о предоставлении информации, перечисленной в пункте 2.1.1 Нагойского протокола, а также принятие надлежащих

эффективных и соразмерных мер для урегулирования ситуаций несоблюдения Нагойского протокола;

предоставление указанной информации, в том числе содержащейся в международно признанном сертификате о соответствии требованиям, если она имеется в наличии, без ущерба для защиты конфиденциальной информации, соответствующим национальным органам власти, Стороне, дающей предварительное обоснованное согласие, и в Механизм посредничества для регулирования доступа к генетическим ресурсам и совместного использования выгод;

направление рекомендаций поставщикам и потребителям генетических ресурсов включать во взаимосогласованные условия положения об обмене информацией по выполнению этих условий, в том числе путем введения требований об отчетности;

направление рекомендаций по использованию экономичных средств и систем коммуникации.

5.2. Обеспечение предоставления и получения информации в соответствии с международно признанным сертификатом о соответствии требованиям, который содержит следующую минимальную информацию, если она не является конфиденциальной:

название органа, выдавшего сертификат;

дата выдачи;

название поставщика;

уникальный идентификатор сертификата;

лицо или организация, которым предоставлено предварительное обоснованное согласие;

объект генетических ресурсов, на который выдан сертификат;

подтверждение заключения взаимосогласованных условий;

подтверждение получения предварительного обоснованного согласия;

вид использования – коммерческий и (или) некоммерческий.

6. Функции Контрольного пункта:

6.1. обеспечение эффективности мер, установленных в статье 17 Нагойского протокола, для мониторинга и повышения прозрачности использования генетических ресурсов;

6.2. оказание информационно-консультативной помощи министерствам, ведомствам и субъектам хозяйствования, деятельность которых подпадает под действие Нагойского протокола;

6.3. осуществление деятельности по повышению информированности поставщиков и потребителей генетических ресурсов о положениях Нагойского протокола по обеспечению мониторинга и прозрачности использования генетических ресурсов;

6.4. урегулирование ситуаций несоблюдения в рамках своей компетенции и (или) путем обращения в Министерство природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь (соответственно случаю).

ГЛАВА 3

ПРАВА И ОБЯЗАННОСТИ КОНТРОЛЬНОГО ПУНКТА

7. Для осуществления своей деятельности Контрольный пункт наделяется следующими правами:

7.1. запрашивать и получать в установленном порядке от государственных органов, юридических и физических лиц необходимые документы и информацию;

7.2. обращаться в Министерство природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь для информирования о случаях несоблюдения Нагойского протокола на территории Республики Беларусь;

Принимать соответствующие случаю меры для урегулирования ситуаций несоблюдения;

7.3. обращаться и получать необходимые юридические, экономические и иные консультации в государственных и ведомственных учреждениях Республики Беларусь, а также в Секретариате Конвенции о биологическом разнообразии;

7.4. обращаться в Министерство природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь с предложениями о формате распространения среди заинтересованных юридических и физических лиц положительного опыта обеспечения доступа к генетическим ресурсам и взаимовыгодного их использования в соответствии с положениями Нагойского протокола.

8. Обязанности Контрольного пункта:

8.1. в полном объеме выполнять функции, возложенные на Контрольный пункт в соответствии с настоящим Положением;

8.2. обеспечивать эффективность выполнения мер по мониторингу и повышению прозрачности использования генетических ресурсов.

ГЛАВА 4 ВЗАИМООТНОШЕНИЯ. СВЯЗИ

9. В своей деятельности Контрольный пункт взаимодействует по вопросам:

анализа и отчетности – с заместителями директора по научной и научной и инновационной работе, ученым секретарем Института, Отделением биологических наук Национальной академии наук Беларуси, отделом научно-организационной и информационно-аналитической работы аппарата Национальной академии наук Беларуси;

осуществления деятельности по запросу необходимой информации в соответствии с установленными функциями и правами – с директором и заместителями директора Института по научной и научной и инновационной работе, Министерством природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь;

принятия мер по обеспечению мониторинга и прозрачности использования генетических ресурсов и урегулирования ситуаций несоблюдения – с директором Института, Министерством природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь.

ГЛАВА 5 ОТВЕТСТВЕННОСТЬ

10. Ответственность за исполнение обязанностей Контрольного пункта несут работники Центра в соответствии с Положением о Центре.

**НАГОЙСКИЙ ПРОТОКОЛ
РЕГУЛИРОВАНИЯ ДОСТУПА
К ГЕНЕТИЧЕСКИМ РЕСУРСАМ
И СОВМЕСТНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
НА СПРАВЕДЛИВОЙ И РАВНОЙ ОСНОВЕ ВЫГОД
ОТ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ К КОНВЕНЦИИ
О БИОЛОГИЧЕСКОМ РАЗНООБРАЗИИ¹**

ТЕКСТ И ПРИЛОЖЕНИЕ

**СЕКРЕТАРИАТ КОНВЕНЦИИ О БИОЛОГИЧЕСКОМ РАЗНООБРАЗИИ
МОНРЕАЛЬ**

**Конвенция о биологическом разнообразии
Организация Объединенных Наций**

¹ Нагойский протокол регулирования доступа к генетическим ресурсам и совместного использования на справедливой и равной основе выгод от их применения к Конвенции о биологическом разнообразии: текст и приложение / Секретариат Конвенции о биологическом разнообразии. – Канада, 2011. – 26 с. – ISBN 92-9225-311-5.

ВВЕДЕНИЕ

Конвенция о биологическом разнообразии была открыта для подписания 5 июня 1992 года на Конференции Организации Объединенных Наций по окружающей среде и развитию (Рио-де-Жанейрский Саммит Земли) и вступила в силу 29 декабря 1993 года. Конвенция является единственным международным документом, всецело посвященным биологическому разнообразию. Три цели Конвенции состоят в сохранении биологического разнообразия, устойчивом использовании его компонентов и совместном получении на справедливой и равной основе выгод, связанных с использованием генетических ресурсов.

Стремясь оказать содействие осуществлению третьей цели Конвенции, Всемирный саммит по устойчивому развитию (Йоханнесбург, сентябрь 2002 года) призвал к проведению переговоров по выработке в рамках Конвенции международного режима поощрения и обеспечения справедливого и равноправного распределения выгод от использования генетических ресурсов. Конференция Сторон Конвенции откликнулась на этот призыв на своем седьмом совещании в 2004 году, поручив своей Специальной рабочей группе по доступу к генетическим ресурсам и совместному использованию выгод разработать и обсудить международный режим регулирования доступа к генетическим ресурсам и совместного использования выгод для обеспечения эффективного осуществления статей 15 (Доступ к генетическим ресурсам) и 8 j) (Традиционные знания) Конвенции и трех ее целей.

Переговоры, продолжавшиеся шесть лет, привели к подписанию 29 октября 2010 года на 10-м совещании Конференции Сторон в Нагое (Япония) Нагойского протокола регулирования доступа к генетическим ресурсам и совместного использования на справедливой и равной основе выгод от их применения к Конвенции о биологическом разнообразии.

Протокол в значительной мере содействует осуществлению третьей цели Конвенции, заложив прочную основу для обеспечения поставщикам и пользователям генетических ресурсов более четкой правовой определенности и прозрачности. Важнейшим нововведением Протокола являются конкретные обязательства в поддержку соблюдения внутреннего законодательства или регулятивных требований Стороны, предоставляющей генетические ресурсы, и договорных обязательств, закрепленных во взаимосогласованных условиях. Данные положения о соблюдении необходимых требований, а также положения, создающие более предсказуемые условия доступа к генетическим ресурсам, будут способствовать гарантии совместного использования выгод в случаях, когда генетические ресурсы вывозятся с территории Стороны-поставщика. Кроме того, положения Протокола о доступе к традиционным знаниям коренных и местных общин, связанным с генетическими ресурсами, расширят возможности данных общин получать выгоды от использования их знаний, нововведений и практики.

Стимулируя использование генетических ресурсов и связанных с ними традиционных знаний и укрепляя возможности совместного использования на справедливой и равной основе выгод от их применения, Протокол будет создавать стимулы к сохранению биологического разнообразия, устойчивому использованию его компонентов и дальнейшему расширению вклада биологического разнообразия в устойчивое развитие и благосостояние человека.

НАГОЙСКИЙ ПРОТОКОЛ РЕГУЛИРОВАНИЯ ДОСТУПА К ГЕНЕТИЧЕСКИМ РЕСУРСАМ И СОВМЕСТНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НА СПРАВЕДЛИВОЙ И РАВНОЙ ОСНОВЕ ВЫГОД ОТ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ К КОНВЕНЦИИ О БИОЛОГИЧЕСКОМ РАЗНООБРАЗИИ

Стороны настоящего Протокола,

будучи Сторонами Конвенции о биологическом разнообразии, именуемой далее как «Конвенция»,

ссылаясь на то, что совместное использование на справедливой и равной основе выгод от применения генетических ресурсов является одной из трех основных целей Конвенции, и признавая, что задачей Протокола является достижение этой цели в рамках Конвенции,

вновь подтверждая суверенные права государств на их природные ресурсы и в соответствии с положениями Конвенции,

ссылаясь далее на статью 15 Конвенции,

признавая важный вклад передачи технологии и технологического сотрудничества в устойчивое развитие для создания исследовательского и новаторского потенциала в целях добавления ценности генетическим ресурсам в развивающихся странах в соответствии со статьями 16 и 19 Конвенции,

признавая, что осведомленность общественности об экономической ценности экосистем и биоразнообразия и совместное использование этой экономической ценности на справедливой и равной основе с хранителями биоразнообразия являются ключевыми стимулами к сохранению биологического разнообразия и устойчивому использованию его компонентов,

признавая потенциальную роль доступа к генетическим ресурсам и совместного использования выгод в оказании содействия сохранению и устойчивому использованию биологического разнообразия, искоренению нищеты и обеспечению экологической устойчивости, что, в свою очередь, содействует достижению Целей развития на тысячелетие,

признавая взаимосвязь между доступом к генетическим ресурсам и совместным использованием на справедливой и равной основе выгод от применения таких ресурсов,

признавая важность обеспечения юридической определенности в отношении доступа к генетическим ресурсам и совместного использования на справедливой и равной основе выгод от их применения,

далее признавая важность стимулирования равенства и справедливости на переговорах о заключении взаимосогласованных условий между поставщиками и пользователями генетических ресурсов,

признавая также жизненно важную роль, которую играют женщины в обеспечении доступа к генетическим ресурсам и совместного использовании выгод, и подтверждая необходимость всемерного участия женщин на всех уровнях формирования и осуществления политики в целях сохранения биоразнообразия,

будучи преисполнены решимости продолжать оказание поддержки эффективному осуществлению положений Конвенции о доступе к генетическим ресурсам и совместном использовании выгод,

признавая, что необходимо новаторское решение для регулирования совместного использования на справедливой и равной основе выгод от применения генетических ресурсов и традиционных знаний, связанных с генетическими ресурсами, которые носят трансграничный характер или для которых невозможно давать или получать предварительное обоснованное согласие,

признавая важное значение генетических ресурсов для создания продовольственной обеспеченности, охраны здоровья, сохранения биоразнообразия и смягчения последствий изменения климата и адаптации к ним,

признавая особый характер биоразнообразия сельского хозяйства, присущие ему особенности и проблемы, требующие особых решений,

признавая взаимозависимость всех стран от генетических ресурсов для производства продовольствия и ведения сельского хозяйства, а также их особый характер и значимость для достижения продовольственной обеспеченности во всем мире и для устойчивого развития сельского хозяйства в контексте борьбы с нищетой и изменения климата и

признавая принципиальную роль Международного договора о генетических ресурсах растений для производства продовольствия и ведения сельского хозяйства и Комиссии ФАО по генетическим ресурсам для производства продовольствия и ведения сельского хозяйства в этой связи,

учитывая Международные медико-санитарные правила (2005 г.) Всемирной организации здравоохранения и важность гарантирования доступа к патогенам человека для обеспечения готовности в области общественного здравоохранения и принятия мер реагирования,

признавая текущую работу на других международных форумах, связанных с доступом к генетическим ресурсам и совместным использованием выгод,

ссылаясь на Многостороннюю систему доступа к генетическим ресурсам и совместного использования выгод, учрежденную в рамках Международного договора о генетических ресурсах растений для производства продовольствия и ведения сельского хозяйства, разработанную в согласовании с Конвенцией о биологическом разнообразии,

признавая, что международные документы, связанные с доступом к генетическим ресурсам и совместным использованием выгод, должны быть взаимодополняющими, чтобы обеспечивать достижение целей Конвенции,

ссылаясь на актуальность статьи 8(j) Конвенции применительно к традиционным знаниям, связанным с генетическими ресурсами, и к совместному использованию на справедливой и равной основе выгод от применения таких знаний,

отмечая взаимосвязь между генетическими ресурсами и традиционными знаниями, неотделимый характер, который они носят для коренных и местных общин, и важное значение традиционных знаний для сохранения биологического разнообразия и устойчивого использования его компонентов и для устойчивой жизнедеятельности данных общин,

признавая разнообразие обстоятельств хранения коренными и местными общинами традиционных знаний, связанных с генетическими ресурсами, или владения такими знаниями, *памятуя*, что коренные и местные общины обладают правом определять в своих общинах законных носителей их традиционных знаний, связанных с генетическими ресурсами, *далее признавая* уникальные обстоятельства, когда в странах имеются традиционные знания, связанные с генетическими ресурсами, актуальные для сохранения и устойчивого использования биологического разнообразия, которые могут существовать в устном или в документированном или в ином виде, отражая богатое культурное наследие, *отмечая* Декларацию Организации Объединённых Наций о правах коренных народов и подтверждая, что ничто в настоящем Протоколе не истолковывается как умаляющее или исключаящее существующие права коренных и местных общин, договорились о нижеследующем:

Статья

1

ЦЕЛЬ

Целью настоящего Протокола является обеспечение совместного использования на справедливой и равной основе выгод от применения генетических ресурсов, в том числе путем обеспечения надлежащего доступа к генетическим ресурсам и надлежащей передачи соответствующих технологий, учитывая все права на данные ресурсы и на технологии, и путем надлежащего финансирования, содействуя таким образом сохранению биологического разнообразия и устойчивому использованию его компонентов.

Статья

2

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕРМИНОВ

Термины, определенные в статье 2 Конвенции, применяются к настоящему Протоколу. Кроме того, для целей настоящего Протокола:

- а) «Конференция Сторон» означает Конференцию Сторон Конвенции;
- б) «Конвенция» означает Конвенцию о биологическом разнообразии;
- с) «использование генетических ресурсов» означает проведение исследований и разработок генетического и/или биотехнологического состава генетических ресурсов, в том числе путем применения биотехнологии, как она определена в статье 2 Конвенции;

d) «биотехнология», как она определена в статье 2 Конвенции о биологическом разнообразии, означает любой вид технологии, связанный с использованием биологических систем, живых организмов или их производных для изготовления или изменения продуктов или процессов с целью их конкретного использования;

e) «дериват» означает естественно встречающееся биохимическое соединение, являющееся результатом генетической экспрессии или метаболизма биологических или генетических ресурсов, даже если он не содержит функциональных единиц наследственности.

Статья

3

СФЕРА ДЕЙСТВИЯ

Настоящий Протокол применяется к генетическим ресурсам в рамках сферы действия статьи 15 Конвенции и к выгодам от использования таких ресурсов. Протокол применяется также к традиционным знаниям, связанным с генетическими ресурсами, в рамках сферы действия Конвенции и к выгодам от применения таких знаний.

Статья

4

ВЗАИМООТНОШЕНИЯ С МЕЖДУНАРОДНЫМИ СОГЛАШЕНИЯМИ И ДОКУМЕНТАМИ

1. Положения настоящего Протокола не затрагивают прав и обязательств любой из Сторон, вытекающих из любых существующих международных соглашений, за исключением случаев, когда осуществление таких прав и обязательств будет причинять серьезный ущерб или создавать серьезную угрозу биологическому разнообразию. Настоящий пункт не преследует цели создания иерархии между настоящим Протоколом и другими международными документами.

2. Ничто в настоящем Протоколе не препятствует разработке и осуществлению Сторонами других соответствующих международных соглашений, включая другие специализированные соглашения о доступе к генетическим ресурсам и совместном использовании выгод, при условии, что они соответствуют целям Конвенции и настоящего Протокола и не противоречат им.

3. Настоящий Протокол реализуется взаимодополняющим образом с другими международными документами, имеющими значение для настоящего Протокола. Следует уделять должное внимание полезной и актуальной текущей работе или практике в рамках таких международных документов и соответствующих международных организаций,

при условии, что они соответствуют целям Конвенции и настоящего Протокола и не противоречат им.

4. Настоящий Протокол является инструментом для осуществления положений Конвенции о доступе к генетическим ресурсам и совместном использовании выгод. В случаях применения специализированного международного документа, регулирующего доступ к генетическим ресурсам и совместное использование выгод, который соответствует целям Конвенции и настоящего Протокола и не противоречит им, настоящий Протокол не применяется для Стороны или Сторон специализированного документа в отношении конкретного генетического ресурса, регулируемого специализированным документом и используемого для его целей.

Статья

5

СОВМЕСТНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВЫГОД НА СПРАВЕДЛИВОЙ И РАВНОЙ ОСНОВЕ

1. В соответствии с пунктами 3 и 7 статьи 15 Конвенции выгоды от применения генетических ресурсов, а также от последующих видов применения и коммерциализации совместно используются на справедливой и равной основе со Стороной, поставляющей такие ресурсы, которая является страной происхождения таких ресурсов или Стороной, которая приобрела генетические ресурсы в соответствии с положениями Конвенции. Такое совместное использование выгод осуществляется на взаимосогласованных условиях.
2. Каждая Сторона принимает законодательные, административные или политические меры (в зависимости от обстоятельств) для обеспечения того, чтобы выгоды от использования генетических ресурсов, которые находятся в ведении коренных и местных общин в соответствии с положениями внутреннего законодательства, регулирующего установленные права данных коренных и местных общин на такие генетические ресурсы, совместно использовались справедливым и равным образом с соответствующими общинами на основе взаимосогласованных условий.
3. Для исполнения вышеприведенного пункта 1 каждая Сторона принимает в зависимости от обстоятельств законодательные, административные или политические меры.
4. Выгоды могут включать денежные и неденежные выгоды, в том числе, но не исключительно, те, что приведены в приложении.
5. Каждая Сторона принимает в зависимости от обстоятельств законодательные, административные или политические меры для обеспечения совместного использования на справедливой и равной основе выгод от применения традиционных знаний, связанных с генетическими ресурсами, с коренными и местными общинами, являющимися носителями таких знаний. Такое совместное использование выгод осуществляется на взаимосогласованных условиях.

Статья

6

ДОСТУП К ГЕНЕТИЧЕСКИМ РЕСУРСАМ

1. При осуществлении суверенных прав на природные ресурсы и при условии соблюдения национального законодательства или регулятивных требований, регулирующих доступ к генетическим ресурсам и совместное использование выгод, доступ к генетическим ресурсам для их использования регулируется на основе предварительного обоснованного согласия Стороны, предоставляющей такие ресурсы, которая является страной происхождения таких ресурсов или Стороной, которая приобрела генетические ресурсы в соответствии с положениями Конвенции, если эта Сторона не решит иначе.
2. В соответствии с положениями внутригосударственного права каждая Сторона принимает соответствующие меры с целью обеспечения того, чтобы доступ к генетическими ресурсам осуществлялся с предварительного обоснованного согласия или одобрения и при участии коренных и местных общин, когда они обладают установленным правом предоставлять доступ к таким ресурсам.
3. Согласно вышеприведенному пункту 1, каждая Сторона, требующая получения предварительного обоснованного согласия, принимает в зависимости от обстоятельств необходимые юридические, административные или политические меры для:
 - a) обеспечения правовой определенности, ясности и прозрачности своего внутригосударственного законодательства или регулятивных требований, регулирующих доступ к генетическим ресурсам и совместное использование выгод;
 - b) установления справедливых и недискриминационных правил и процедур доступа к генетическим ресурсам;
 - c) обеспечения информации о процедуре подачи заявок на получение предварительного обоснованного согласия;
 - d) представления компетентным национальным органом четкого и прозрачного письменного решения экономичным образом и в разумные сроки;
 - e) обеспечения выдачи в момент доступа разрешения или эквивалентного документа в качестве доказательства принятого решения о предоставлении предварительного обоснованного согласия и заключения взаимосогласованных условий и соответствующего уведомления об этом Механизма посредничества для регулирования доступа к генетическим ресурсам и совместного использования выгод;
 - f) разработки в случаях применимости и в соответствии с внутригосударственным законодательством критериев и/или процессов получения предварительного обоснованного согласия или санкции коренных и местных общин на доступ к генетическим ресурсам и их участия в предоставлении такого доступа; и
 - g) введения четких правил и процедур требования и установления взаимосогласованных условий. Такие условия оформляются в письменном виде и могут включать:

- i) положение об урегулировании споров;
- ii) условия совместного использования выгод, в том числе в отношении прав интеллектуальной собственности;
- iii) условия последующего использования третьей стороной, если оно имеет место; и
- iv) положения об изменении намерений (в случаях применимости).

Статья

7

ДОСТУП К ТРАДИЦИОННЫМ ЗНАНИЯМ, СВЯЗАННЫМ С ГЕНЕТИЧЕСКИМИ РЕСУРСАМИ

В соответствии с положениями внутригосударственного права каждая Сторона принимает соответствующие меры с целью обеспечения того, чтобы доступ к традиционным знаниям, связанным с генетическими ресурсами, носителями которых являются коренные и местные общины, осуществлялся с предварительного и обоснованного согласия или одобрения и при участии данных коренных и местных общин и чтобы были установлены взаимосогласованные условия.

Статья

8

ОСОБЫЕ СООБРАЖЕНИЯ

В процессе разработки и реализации своего законодательства или регулятивных требований, регулирующих доступ к генетическим ресурсам и совместное использование выгод, каждая Сторона:

- a) создает условия для стимулирования и поощрения исследований, содействующих сохранению и устойчивому использованию биологического разнообразия, и особенно в развивающихся странах, в том числе путем применения упрощенных мер предоставления доступа к генетическим ресурсам для некоммерческих исследовательских целей, принимая во внимание необходимость решения вопроса об изменении целей таких исследований;
- b) обращает надлежащее внимание на возникшие или надвигающиеся чрезвычайные ситуации, угрожающие или наносящие ущерб здоровью людей, животных или растений, согласно национальным или международным определениям. Стороны могут принимать во внимание необходимость ускоренных процедур доступа к генетическим ресурсам и ускоренных процедур совместного использования выгод от применения таких генетических

ресурсов на справедливой и равной основе, включая возможности получения доступного обслуживания для нуждающихся, особенно в развивающихся странах;

с) учитывает важность генетических ресурсов для производства продовольствия и ведения сельского хозяйства и их особую роль в создании продовольственной обеспеченности.

Статья

9

ВКЛАД В СОХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

Стороны поощряют пользователей и поставщиков направлять выгоды от использования генетических ресурсов на дело сохранения и устойчивого использования биологического разнообразия и устойчивого использования его компонентов.

Статья

10

ГЛОБАЛЬНЫЙ МНОГОСТОРОННИЙ МЕХАНИЗМ СОВМЕСТНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ВЫГОД

Стороны изучают необходимость создания и условия функционирования глобального многостороннего механизма совместного использования выгод для обеспечения совместного использования на справедливой и равной основе выгод от применения генетических ресурсов и традиционных знаний, связанных с генетическими ресурсами, которые носят трансграничный характер или для которых невозможно предоставлять или получать предварительное обоснованное согласие. Выгоды, совместно используемые пользователями генетических ресурсов и традиционных знаний, связанных с генетическими ресурсами, через посредство настоящего механизма, используются в целях оказания поддержки сохранению биологического разнообразия и устойчивого использования его компонентов в глобальном масштабе.

Статья

11

ТРАНСГРАНИЧНОЕ СОТРУДНИЧЕСТВО

1. В случаях, когда аналогичные генетические ресурсы встречаются in-situ на территории более чем одной Стороны, такие Стороны стремятся сотрудничать надлежащим образом,

привлекая, где это применимо, соответствующие коренные и местные общины, в целях осуществления настоящего Протокола.

2. В случаях, когда аналогичные традиционные знания, связанные с генетическими ресурсами, являются достоянием одной или нескольких коренных и местных общин на территории нескольких Сторон, эти Стороны стремятся сотрудничать надлежащим образом, привлекая соответствующие коренные и местные общины, в целях осуществления цели настоящего Протокола.

Статья

12

ТРАДИЦИОННЫЕ ЗНАНИЯ, СВЯЗАННЫЕ С ГЕНЕТИЧЕСКИМИ РЕСУРСАМИ

1. При выполнении своих обязательств в рамках настоящего Протокола Стороны в соответствии с положениями внутригосударственного права учитывают сообразно обстоятельствам нормы обычного права, общинные протоколы и процедуры коренных и местных общин в отношении традиционных знаний, связанных с генетическими ресурсами.

2. Стороны при эффективном участии соответствующих коренных и местных общин внедряют механизмы для информирования потенциальных пользователей традиционных знаний, связанных с генетическими ресурсами, об их обязанностях, в том числе о мерах, обеспечиваемых через посредство Механизма посредничества для регулирования доступа к генетическим ресурсам и совместного использования выгод, в отношении доступа к таким знаниям и совместного использования на справедливой и равной основе выгод от их применения.

3. Стороны стремятся оказывать в соответствующих случаях поддержку разработке коренными и местными общинами, включая женщин в этих общинах:

- а) общинных протоколов, регулирующих доступ к традиционным знаниям, связанным с генетическими ресурсами, и совместное использование на справедливой и равной основе выгод от применения таких знаний;
- б) минимальных требований о гарантировании во взаимосогласованных условиях совместного использования на справедливой и равной основе выгод от применения традиционных знаний, связанных с генетическими ресурсами; и
- в) типовых договорных положений о совместном использовании выгод от применения традиционных знаний, связанных с генетическими ресурсами.

4. Стороны при осуществлении настоящего Протокола стараются насколько возможно не ограничивать традиционного использования генетических ресурсов и связанных с ними традиционных знаний и традиционный обмен ими внутри и среди коренных и местных общин в соответствии с целями Конвенции

Статья

13

**НАЦИОНАЛЬНЫЕ КООРДИНАЦИОННЫЕ ЦЕНТРЫ И
КОМПЕТЕНТНЫЕ НАЦИОНАЛЬНЫЕ ОРГАНЫ**

1. Каждая Сторона назначает один национальный координационный центр по вопросам доступа к генетическим ресурсам и совместного использования выгод.

Национальные координационные центры предоставляют следующую информацию:

- а) для заявителей, желающих получить доступ к генетическим ресурсам, информацию о порядке получения предварительного обоснованного согласия и заключения взаимосогласованных условий, включающих совместное использование выгод;
- б) для заявителей, желающих получить доступ к традиционным знаниям, связанным с генетическими ресурсами, по возможности информацию о порядке получения предварительного обоснованного согласия или одобрения и участия (в зависимости от случая) коренных и местных общин и заключения взаимосогласованных условий, включающих совместное использование выгод; и
- с) информацию о компетентных национальных органах, соответствующих коренным и местным общинам и соответствующих субъектах деятельности.

Национальный координационный центр отвечает за связь с секретариатом.

2. Каждая Сторона назначает один или несколько компетентных национальных органов по вопросам доступа к генетическим ресурсам и совместного использования выгод. Компетентные национальные органы отвечают в соответствии с применимыми национальными законодательными, административными или политическими мерами за предоставление доступа или выдачу в соответствующих случаях письменного подтверждения того, что требования, регулирующие доступ, выполнены, и отвечают за консультирование по вопросам действующих процедур и требований, регулирующих получение предварительного обоснованного согласия и заключение взаимосогласованных условий.

3. Сторона может назначить одну инстанцию для выполнения функций как координационного центра, так и компетентного национального органа.

4. Каждая Сторона не позднее даты вступления настоящего Протокола в силу для этой Стороны сообщает в секретариат контактные данные ее национального координационного центра и ее компетентного национального органа или органов. Если Сторона назначает более одного компетентного национального органа, она направляет в секретариат вместе со своим уведомлением о них надлежащую информацию о соответствующих обязанностях таких органов. В случаях применимости в такой информации как минимум указывается, какой именно компетентный орган отвечает за генетические ресурсы, к которым запрашивается доступ. Каждая Сторона незамедлительно информирует секретариат о любых изменениях в назначении ее национального координационного центра или контактных данных или обязанностей ее компетентного национального органа или органов.

5. Секретариат распространяет информацию, полученную им в соответствии с вышеприведенным пунктом 4, через Механизм посредничества для регулирования доступа к генетическим ресурсам и совместного использования выгод.

Статья

14

МЕХАНИЗМ ПОСРЕДНИЧЕСТВА ДЛЯ РЕГУЛИРОВАНИЯ ДОСТУПА К ГЕНЕТИЧЕСКИМ РЕСУРСАМ И СОВМЕСТНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ВЫГОД И ОБМЕН ИНФОРМАЦИЕЙ

1. Настоящим учреждается Механизм посредничества для регулирования доступа к генетическим ресурсам и совместного использования выгод в качестве части механизма посредничества, созданного в соответствии с пунктом 3 статьи 18 Конвенции. Он служит средством обмена информацией о доступе к генетическим ресурсам и совместном использовании выгод. Он в частности обеспечивает доступ к информации об осуществлении настоящего Протокола, распространяемой каждой Стороной.

2. Без ущерба для защиты конфиденциальной информации каждая Сторона представляет в Механизм посредничества для регулирования доступа к генетическим ресурсам и совместного использования выгод любую информацию, требуемую в соответствии с настоящим Протоколом, а также информацию, требуемую в соответствии с решениями, принятыми Конференцией Сторон, выступающей в качестве Совещания Сторон настоящего Протокола. Такая информация включает:

- a) законодательные, административные и политические меры, регулирующие доступ к генетическим ресурсам и совместное использование выгод;
- b) сведения о национальном координационном центре и компетентном национальном органе или органах; и
- c) разрешения или эквивалентные документы, выданные в момент осуществления доступа в качестве доказательства принятого решения о предоставлении предварительного обоснованного согласия и заключения взаимосогласованных условий.

3. Дополнительная информация, если таковая имеется и когда это уместно, может включать:

- a) сведения о соответствующих компетентных органах коренных и местных общин и информацию, которая будет оговорена;
- b) типовые договорные положения;
- c) методы и инструменты, разработанные для мониторинга генетических ресурсов; и
- d) кодексы поведения и передовые методы.

4. Условия функционирования Механизма посредничества для регулирования доступа к генетическим ресурсам и совместного использования выгод, включая представление

отчетности о его деятельности, рассматриваются и определяются Конференцией Сторон, выступающей в качестве Совещания Сторон настоящего Протокола, на ее первом совещании и периодически пересматриваются в дальнейшем.

Статья

15

ВЫПОЛНЕНИЕ ПОЛОЖЕНИЙ НАЦИОНАЛЬНОГО ЗАКОНОДАТЕЛЬСТВА ИЛИ РЕГУЛЯТИВНЫХ ТРЕБОВАНИЙ, РЕГУЛИРУЮЩИХ ДОСТУП К ГЕНЕТИЧЕСКИМ РЕСУРСАМ И СОВМЕСТНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВЫГОД

1. Каждая Сторона принимает надлежащие, эффективные и соразмерные законодательные, административные или политические меры для обеспечения того, чтобы доступ к генетическим ресурсам, используемым в пределах ее юрисдикции, осуществлялся в соответствии с предварительным обоснованным согласием и чтобы были заключены взаимосогласованные условия, как определено в национальном законодательстве, регулирующем доступ к генетическим ресурсам и совместное использование выгод, или в регулятивных требованиях другой Стороны.
2. Стороны принимают надлежащие, эффективные и соразмерные меры для урегулирования ситуаций несоблюдения мер, принятых в соответствии с вышеприведенным пунктом 1.
3. Стороны сотрудничают, насколько это возможно и целесообразно, в случаях предполагаемого нарушения национального законодательства или требований, регулирующих доступ к генетическим ресурсам и совместное использование выгод, о которых говорится в вышеприведенном пункте 1.

Статья

16

ВЫПОЛНЕНИЕ ПОЛОЖЕНИЙ НАЦИОНАЛЬНОГО ЗАКОНОДАТЕЛЬСТВА ИЛИ РЕГУЛЯТИВНЫХ ТРЕБОВАНИЙ, РЕГУЛИРУЮЩИХ ДОСТУП К ГЕНЕТИЧЕСКИМ РЕСУРСАМ И СОВМЕСТНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВЫГОД, В ОТНОШЕНИИ ТРАДИЦИОННЫХ ЗНАНИЙ, СВЯЗАННЫХ С ГЕНЕТИЧЕСКИМИ РЕСУРСАМИ

1. Каждая Сторона принимает соответственно случаю надлежащие эффективные и соразмерные законодательные, административные или политические меры для обеспечения того, чтобы доступ к традиционным знаниям, связанным с генетическими ресурсами, которые используются в пределах ее юрисдикции, осуществлялся в соответствии с предварительным обоснованным

согласием или с одобрения и при участии коренных и местных общин и чтобы были установлены взаимосогласованные условия, как определено в национальном законодательстве, регулирующем доступ к генетическим ресурсам и совместное использование выгод, или в регулятивных требованиях другой Стороны, где находятся такие коренные и местные общины.

2. Каждая Сторона принимает надлежащие, эффективные и соразмерные меры для урегулирования ситуаций несоблюдения мер, принятых в соответствии с вышеприведенным пунктом 1.

3. Стороны сотрудничают, насколько это возможно и целесообразно, в случаях предполагаемого нарушения национального законодательства или регулятивных требований, регулирующих доступ к генетическим ресурсам и совместное использование выгод, о которых говорится в вышеприведенном пункте 1.

Статья

17

МОНИТОРИНГ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ

1. В целях оказания поддержки соблюдению каждая Сторона принимает меры соответственно случаю для мониторинга и повышения прозрачности использования генетических ресурсов. Такие меры включают:

а) назначение одного или нескольких контрольных пунктов следующим образом:

i) назначенные контрольные пункты будут соответственно случаю получать или собирать информацию, связанную с предварительным обоснованным согласием, источником генетического ресурса, с заключением взаимосогласованных условий и/или с использованием генетических ресурсов (в зависимости от обстоятельств);

ii) каждая Сторона соответственно случаю и в зависимости от определенного характера назначенного контрольного пункта требует от пользователей генетических ресурсов представления в назначенном контрольном пункте информации, конкретно перечисленной в вышеприведенном пункте. Каждая Сторона принимает надлежащие эффективные и соразмерные меры для урегулирования ситуаций несоблюдения;

iii) такая информация, в том числе содержащаяся в международно признанном сертификате о соответствии требованиям, если она имеется в наличии, будет без ущерба для защиты конфиденциальной информации представляться соответствующим национальным органам власти, Стороне, дающей предварительное обоснованное согласие, и в Механизм посредничества для регулирования доступа к генетическим ресурсам и совместного использования выгод (в зависимости от обстоятельств);

iv) контрольные пункты должны быть эффективными и должны быть наделены функциями, имеющими отношение к осуществлению настоящего подпункта (а). Они должны иметь отношение к использованию генетических ресурсов или к сбору соответствующей информации на любом этапе исследований, разработок, введения новшеств, подготовки к коммерциализации или коммерциализации;

b) поощрение пользователей и поставщиков генетических ресурсов включать во взаимосогласованные условия положения об обмене информацией о выполнении таких условий, в том числе путем введения требований об отчётности; и

c) поощрение использования экономичных средств и систем коммуникации.

2. Разрешение или его эквивалент, выданные в соответствии с пунктом 3(е) статьи 6 и представленные в Механизм посредничества для регулирования доступа к генетическим ресурсам и совместного использования выгод, являются международно признанным сертификатом о соответствии требованиям.

3. Международно признанный сертификат о соответствии требованиям служит доказательством того, что генетический ресурс, для которого он выдан, стал объектом доступа в соответствии с предварительным обоснованным согласием и что были заключены взаимосогласованные условия в соответствии с требованиями национального законодательства и национального права, регулирующего доступ к генетическим ресурсам и совместное использование выгод, или регулятивными требованиями Стороны, предоставляющей предварительное обоснованное согласие.

4. Международно признанный сертификат о соответствии требованиям содержит следующую минимальную информацию, если она не является конфиденциальной:

- a) название органа, выдавшего сертификат;
- b) дату выдачи;
- c) название поставщика;
- d) уникальный идентификатор сертификата;
- e) лицо или организацию, которым предоставлено предварительное обоснованное согласие;
- f) предмет генетических ресурсов, на которые выдан сертификат;
- g) подтверждение заключения взаимосогласованных условий;
- h) подтверждение получения предварительного обоснованного согласия; и
- i) вид использования — коммерческий и/или некоммерческий.

Статья

18

СОБЛЮДЕНИЕ ВЗАИМОСОГЛАСОВАННЫХ УСЛОВИЙ

1. При осуществлении подпункта (i) пункта 3(g) статьи 6 и статьи 7 каждая Сторона поощряет поставщиков и пользователей генетических ресурсов и/или традиционных знаний, связанных с генетическими ресурсами, включать по мере необходимости во

взаимосогласованные условия положения об урегулировании споров, включающие:

- a) юрисдикцию, в которую они передадут любой процесс урегулирования споров;
- b) применимый закон; и/или
- c) варианты альтернативного урегулирования споров, такие как посредничество или арбитраж.

2. Каждая Сторона обеспечивает возможность обращения за помощью в рамках своих правовых систем в соответствии с применимыми юрисдикционными требованиями в случаях возникновения споров, проистекающих из взаимосогласованных условий.

3. Каждая Сторона принимает в соответствующих случаях эффективные меры для:

- a) обеспечения доступа к правосудию; и
- b) использования механизмов для обеспечения взаимного признания и выполнения решений, вынесенных иностранным судом, и арбитражных решений.

4. Конференция Сторон, выступающая в качестве Сопредседателя Сторон настоящего Протокола, проводит обзор эффективности настоящей статьи в соответствии со статьей 31 настоящего Протокола.

Статья

19

ТИПОВЫЕ ДОГОВОРНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. Каждая Сторона поощряет в соответствующих случаях разработку, обновление и применение секторальных и межсекторальных типовых договорных положений для включения во взаимосогласованные условия.

2. Конференция Сторон, выступающая в качестве Сопредседателя Сторон настоящего Протокола, периодически рассматривает использование секторальных и межсекторальных типовых договорных положений.

Статья

20

КОДЕКСЫ ПОВЕДЕНИЯ, РУКОВОДЯЩИЕ УКАЗАНИЯ И ПЕРЕДОВЫЕ МЕТОДЫ И/ИЛИ СТАНДАРТЫ

1. Каждая Сторона поощряет в соответствующих случаях разработку, обновление и

использование добровольных кодексов поведения, руководящих указаний и передовых методов и/или стандартов в области доступа к генетическим ресурсам и совместного использования выгод.

2. Конференция Сторон, выступающая в качестве Совещания Сторон настоящего Протокола, периодически рассматривает использование добровольных кодексов поведения, руководящих указаний, передовых методов и/или стандартов и рассматривает вопрос о принятии конкретных кодексов поведения, руководящих указаний, передовых методов и/или стандартов.

Статья

21

ПОВЫШЕНИЕ ОСВЕДОМЛЕННОСТИ

Каждая Сторона принимает меры к повышению осведомленности о важном значении генетических ресурсов и традиционных знаний, связанных с генетическими ресурсами, а также о смежных вопросах доступа к генетическим ресурсам и совместного использования выгод. Такие меры могут включать, кроме всего прочего:

- a) популяризацию настоящего Протокола, включая его цели;
- b) организацию совещаний коренных и местных общин и соответствующих субъектов деятельности;
- c) создание и поддержание службы помощи для коренных и местных общин и соответствующих субъектов деятельности;
- d) распространение информации через национальный механизм посредничества;
- e) популяризацию добровольных кодексов поведения, руководящих указаний и передовых методов и/или стандартов при консультациях с коренными и местными общинами и соответствующими субъектами деятельности;
- f) стимулирование в соответствующих случаях национального, регионального и международного обмена опытом;
- g) просвещение и подготовку пользователей и поставщиков генетических ресурсов и традиционных знаний, связанных с генетическими ресурсами, относительно их обязательств, касающихся доступа к генетическим ресурсам и совместного использования выгод;
- h) привлечение коренных и местных общин и соответствующих субъектов деятельности к осуществлению настоящего Протокола; и
- i) повышение осведомленности об общинных протоколах и процедурах коренных и местных общин.

Статья

22**ПОТЕНЦИАЛ**

1. Стороны сотрудничают в создании потенциала, развитии потенциала и укреплении людских ресурсов и организационного потенциала в целях эффективного осуществления настоящего Протокола в Сторонах, являющихся развивающимися странами, и в частности наименее развитыми странами и малыми островными развивающимися государствами среди них, и в Сторонах, являющихся странами с переходной экономикой, в том числе через посредство существующих глобальных, региональных, субрегиональных и национальных учреждений и организаций. В этом контексте Стороны должны содействовать привлечению к работе коренных и местных общин и соответствующих субъектов деятельности, включая неправительственные организации и частный сектор.
2. Потребности Сторон, являющихся развивающимися странами, и в частности наименее развитыми странами и малыми островными развивающимися государствами среди них, и Сторон с переходной экономикой в финансовых ресурсах согласно соответствующим положениям Конвенции в полной мере учитываются при создании потенциала и развитии для целей осуществления настоящего Протокола.
3. В качестве основы для принятия надлежащих мер по осуществлению настоящего Протокола Стороны, являющиеся развивающимися странами, и в частности наименее развитыми странами и малыми островными развивающимися государствами среди них, и Стороны с переходной экономикой должны выявить свои потребности и приоритеты в создании национального потенциала путем проведения самооценок национального потенциала. При этом такие Стороны должны поддерживать потребности и приоритеты в создании потенциала коренных и местных общин и соответствующих субъектов деятельности, определенных ими, и особо выделять потребности в потенциале и приоритеты женщин.
4. В поддержку реализации настоящего Протокола создание потенциала и развитие потенциала могут охватывать, кроме всего прочего, следующие ключевые области:
 - a) потенциал для осуществления и соблюдения обязательств в рамках настоящего Протокола;
 - b) потенциал для ведения переговоров о взаимосогласованных условиях;
 - c) потенциал для разработки, введения и обеспечения соблюдения национальных законодательных, административных или политических мер, регулирующих доступ к генетическим ресурсам и совместное использование выгод; и
 - d) возможности стран развивать свои внутренние научно-исследовательские способности добавлять стоимость собственным генетическим ресурсам.
5. Меры, принимаемые в соответствии с вышеприведенными пунктами 1–4, могут включать, кроме всего прочего:

- a) правовое и организационное строительство;
 - b) стимулирование равенства и справедливости позиций на переговорах, как, например, обучение навыкам ведения переговоров о заключении взаимосогласованных условий;
 - c) мониторинг и обеспечение соблюдения условий;
 - d) использование наилучших существующих средств коммуникации и систем на базе Интернета для реализации мероприятий по обеспечению доступа к генетическим ресурсам и совместного использования выгод;
 - e) разработку и применение методов стоимостной оценки;
 - f) биоразведку и соответствующие научные и таксономические исследования;
 - g) передачу технологии и создание инфраструктуры и технического потенциала для обеспечения устойчивости такой передачи технологии;
 - h) расширение вклада мероприятий по обеспечению доступа к генетическим ресурсам и совместного использования выгод в сохранение биоразнообразия и устойчивое использование его компонентов;
 - i) особые меры для расширения возможностей соответствующих субъектов деятельности, связанных с обеспечением доступа к генетическим ресурсам и совместным использованием выгод; и
 - j) особые меры по расширению возможностей коренных и местных общин с уделением внимания расширению возможностей женщин в таких общинах в плане доступа к генетическим ресурсам и/или традиционным знаниям, связанным с генетическими ресурсами.
6. Информацию об инициативах по созданию потенциала и развитию на национальном, региональном и международном уровнях, реализуемых в соответствии с вышеприведенными пунктами 1–5, следует представлять в Механизм посредничества в целях стимулирования взаимодействия и координации в создании потенциала и развитии для обеспечения доступа к генетическим ресурсам и совместного использования выгод.

Статья

23

ПЕРЕДАЧА ТЕХНОЛОГИИ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ И СОТРУДНИЧЕСТВО

В соответствии с положениями статей 15, 16, 18 и 19 Конвенции Стороны сотрудничают и взаимодействуют для реализации программ технических и научных исследований и развития, и в том числе научной деятельности в области биотехнологий, в качестве одного из средств достижения цели настоящего Протокола.

Стороны обязуются стимулировать и поощрять доступ к технологии Сторон, являющихся развивающимися странами, и в частности наименее развитыми странами и малыми островными развивающимися государствами среди них, и Сторон с переходной экономикой и передачу им технологии в целях создания возможностей развития и укрепления надежной и жизнеспособной научно-технологической базы для достижения целей Конвенции и настоящего Протокола. В случаях возможности и целесообразности такие совместные мероприятия осуществляются в Стороне или в Сторонах и совместно со Стороной или со Сторонами, которые приобрели генетические ресурсы в соответствии с положениями Конвенции.

Статья

24

ГОСУДАРСТВА, НЕ ЯВЛЯЮЩИЕСЯ СТОРОНАМИ

Стороны поощряют государства, не являющиеся Сторонами, присоединиться к настоящему Протоколу и представлять соответствующую информацию в Механизм посредничества для регулирования доступа к генетическим ресурсам и совместного использования выгод.

Статья

25

МЕХАНИЗМ ФИНАНСИРОВАНИЯ И ФИНАНСОВЫЕ РЕСУРСЫ

1. При рассмотрении вопроса о финансовых ресурсах для осуществления настоящего Протокола Стороны учитывают положения статьи 20 Конвенции.
2. Механизм финансирования Конвенции является механизмом финансирования настоящего Протокола.
3. В отношении создания потенциала и развития, о которых говорится в статье 22 настоящего Протокола, Конференция Сторон, выступающая в качестве Совещания Сторон настоящего Протокола, при выработке руководящих указаний в отношении механизма финансирования, упомянутого выше, в пункте 2, для рассмотрения Конференцией Сторон учитывает потребности Сторон, являющихся развивающимися странами, и в частности наименее развитыми странами и малыми островными развивающимися государствами среди них, и Сторон с переходной экономикой в финансовых ресурсах, а также потребности и приоритеты в создании потенциала коренных и местных общин, включая женщин в таких общинах.
4. В контексте вышеприведенного пункта 1 Стороны также учитывают потребности Сторон, являющихся развивающимися странами, и в частности наименее развитыми странами и малыми островными развивающимися государствами среди них, и Сторон с переходной экономикой в их деятельности по определению и обеспечению своих потребностей в создании потенциала и развитии для целей осуществления настоящего Протокола.

5. Руководящие указания механизму финансирования Конвенции в соответствующих решениях Конференции Сторон, включая те, которые сформулированы до принятия настоящего Протокола, применяются *mutatis mutandis* к положениям настоящей статьи.
6. Стороны, являющиеся развитыми странами, могут также предоставлять, а Стороны, являющиеся развивающимися странами, и Стороны с переходной экономикой могут получать по двусторонним, региональным и многосторонним каналам финансовые и другие ресурсы для осуществления положений настоящего Протокола.

Статья

26

КОНФЕРЕНЦИЯ СТОРОН, ВЫСТУПАЮЩАЯ В КАЧЕСТВЕ СОВЕЩАНИЯ СТОРОН НАСТОЯЩЕГО ПРОТОКОЛА

1. Конференция Сторон выступает в качестве Совещания Сторон настоящего Протокола.
2. Стороны Конвенции, не являющиеся Сторонами настоящего Протокола, могут принимать участие в качестве наблюдателей в работе любого совещания Конференции Сторон, выступающей в качестве Совещания Сторон настоящего Протокола. Когда Конференция Сторон выступает в качестве Совещания Сторон настоящего Протокола, решения в рамках настоящего Протокола принимаются только представителями его Сторон.
3. Когда Конференция Сторон выступает в качестве Совещания Сторон настоящего Протокола, любой член бюро Конференции Сторон, представляющий какую-либо Сторону Конвенции, которая в это время не является, однако, Стороной настоящего Протокола, заменяется членом, избираемым Сторонами настоящего Протокола и из их числа.
4. Конференция Сторон, выступающая в качестве Совещания Сторон настоящего Протокола, постоянно следит за осуществлением настоящего Протокола и принимает в рамках своего мандата решения, необходимые для содействия его эффективному осуществлению. Она выполняет функции, возложенные на нее в соответствии с настоящим Протоколом, и:
 - a) выносит рекомендации по любым вопросам, необходимым для осуществления настоящего Протокола;
 - b) создает такие вспомогательные органы, которые считаются необходимыми для осуществления настоящего Протокола;
 - c) запрашивает и использует в соответствующих случаях услуги, содействие и информацию, предоставляемые компетентными международными организациями и межправительственными и неправительственными органами;
 - d) определяет форму и периодичность поступления информации, подлежащей представлению в соответствии со статьей 29 настоящего Протокола, и рассматривает такую информацию, а также доклады, представленные любым вспомогательным органом;
 - e) рассматривает и принимает по мере необходимости поправки к настоящему Протоколу и приложению к нему, а также любые дополнительные приложения к настоящему Протоколу,

которые считаются необходимыми для осуществления настоящего Протокола; и

f) выполняет такие другие функции, которые могут потребоваться для осуществления настоящего Протокола.

5. В рамках настоящего Протокола применяются *mutatis mutandis* правила процедуры Конференции Сторон, а также финансовые правила Конвенции, за исключением случаев, когда Конференция Сторон, выступающая в качестве Совещания Сторон настоящего Протокола, может консенсусом принимать иное решение.

6. Первое совещание Конференции Сторон, выступающей в качестве Совещания Сторон настоящего Протокола, созывается секретариатом и проводится одновременно с первым совещанием Конференции Сторон, проведение которого запланировано после даты вступления в силу настоящего Протокола. Последующие очередные совещания Конференции Сторон, выступающей в качестве Совещания Сторон настоящего Протокола, проводятся одновременно с очередными совещаниями Конференции Сторон, если Конференция Сторон, выступающая в качестве Совещания Сторон настоящего Протокола, не примет иное решение.

7. Внеочередные совещания Конференции Сторон, выступающей в качестве Совещания Сторон настоящего Протокола, созываются тогда, когда Конференция Сторон, выступающая в качестве Совещания Сторон настоящего Протокола, может счесть это необходимым, или по письменной просьбе любой Стороны, при условии, что в течение шести месяцев после того, как секретариат известит Стороны о такой просьбе, она будет поддержана по крайней мере одной третьей Сторон.

8. Организация Объединенных Наций, ее специализированные учреждения и Международное агентство по атомной энергии, а также любое государство, являющееся их членом, или наблюдатели при них, которые не являются Сторонами Конвенции, могут быть представлены на совещаниях Конференции Сторон, выступающей в качестве Совещания Сторон настоящего Протокола, как наблюдатели. Любые органы или учреждения, национальные или международные, правительственные или неправительственные, обладающие компетенцией по вопросам, охватываемым настоящим Протоколом, которые известили секретариат о своем желании быть представленными в качестве наблюдателей на совещании Конференции Сторон, выступающей в качестве Совещания Сторон настоящего Протокола, могут быть допущены к участию в нем, если только против этого не возражает по крайней мере одна треть присутствующих Сторон. За исключением иных случаев, предусмотренных в настоящей статье, допуск и участие наблюдателей регулируются правилами процедуры, упомянутыми в вышеприведенном пункте 5.

Статья

27

ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ ОРГАНЫ

1. Любой вспомогательный орган, учрежденный Конвенцией или в ее рамках, может оказывать услуги Протоколу, в том числе в соответствии с решением Конференции Сторон,

выступающей в качестве Совещания Сторон Протокола. В любом таком решении конкретно определяются задачи, подлежащие выполнению.

2. Стороны Конвенции, которые не являются Сторонами настоящего Протокола, могут принимать участие в качестве наблюдателей в работе любого совещания любых таких вспомогательных органов. В тех случаях, когда вспомогательный орган Конвенции выступает в качестве вспомогательного органа настоящего Протокола, решения в рамках Протокола принимаются только Сторонами Протокола.

3. В тех случаях, когда вспомогательный орган Конвенции выполняет свои функции в связи с вопросами, касающимися настоящего Протокола, любой член бюро такого вспомогательного органа, представляющий Сторону Конвенции, которая в это время не является, однако, Стороной Протокола, заменяется членом, избираемым Сторонами Протокола и из их числа.

Статья

28

СЕКРЕТАРИАТ

1. Секретариат, учрежденный в соответствии со статьей 24 Конвенции, выступает в качестве секретариата настоящего Протокола.

2. Пункт 1 статьи 24 Конвенции о функциях секретариата применяется *mutatis mutandis* к настоящему Протоколу.

3. В той мере, в какой расходы на услуги, оказываемые секретариатом настоящему Протоколу, отличны от иных расходов, они покрываются Сторонами настоящего Протокола. Конференция Сторон, выступающая в качестве Совещания Сторон настоящего Протокола, на своем первом совещании принимает решение относительно соответствующих бюджетных мер, необходимых для этой цели.

Статья

29

МОНИТОРИНГ И ОТЧЕТНОСТЬ

Каждая Сторона осуществляет контроль за выполнением своих обязательств в рамках настоящего Протокола и с периодичностью и в формате, определяемыми Конференцией Сторон, выступающей в качестве Совещания Сторон настоящего Протокола, отчитывается перед Конференцией Сторон, выступающей в качестве Совещания Сторон настоящего Протокола, о мерах, принятых ею в осуществление Протокола.

Статья

30**ПРОЦЕДУРЫ И МЕХАНИЗМЫ, СТИМУЛИРУЮЩИЕ СОБЛЮДЕНИЕ
НАСТОЯЩЕГО ПРОТОКОЛА**

Конференция Сторон, выступающая в качестве Совещания Сторон настоящего Протокола, на своем первом совещании рассматривает и утверждает совместные процедуры и организационные механизмы для содействия соблюдению положений настоящего Протокола и рассмотрению случаев несоблюдения. В таких процедурах и механизмах предусматривается оказание по мере необходимости консультативных услуг или помощи. Они применяются независимо от процедур и механизмов урегулирования споров в рамках статьи 27 Конвенции и без ущерба для них.

Статья

31**ОЦЕНКА И ОБЗОР**

Конференция Сторон, выступающая в качестве Совещания Сторон настоящего Протокола, через четыре года после вступления в силу настоящего Протокола и затем с периодичностью, установленной Конференцией Сторон, выступающей в качестве Совещания Сторон настоящего Протокола, проводит оценку эффективности настоящего Протокола.

Статья

32**ПОДПИСАНИЕ**

Настоящий Протокол открыт для подписания Сторонами Конвенции в Центральных учреждениях Организации Объединенных Наций в Нью-Йорке со 2 февраля 2011 года по 1 февраля 2012 года.

Статья

33**ВСТУПЛЕНИЕ В СИЛУ**

1. Настоящий Протокол вступает в силу на девяностый день со дня сдачи на хранение пятидесятого документа о ратификации, принятии, одобрении или присоединении

государствами или региональными организациями экономической интеграции, которые являются Сторонами Конвенции.

2. Для государства или региональной организации экономической интеграции, которые ратифицируют, принимают или одобряют настоящий Протокол или присоединяются к нему после сдачи на хранение пятидесятого документа, о котором говорится выше, в пункте 1, настоящий Протокол вступает в силу на девяностый день после сдачи на хранение таким государством или региональной организацией экономической интеграции своего документа о ратификации, принятии, одобрении или присоединении или в тот день, когда Конвенция вступает в силу для такого государства или региональной организации экономической интеграции, в зависимости от того, что наступает позднее.

3. Для целей вышеприведенных пунктов 1 и 2 ни один из документов, сданных на хранение региональной организацией экономической интеграции, не считается дополнительным к документам, сданным на хранение государствами-членами такой организации.

Статья

34

ОГОВОРКИ

Никакие оговорки к настоящему Протоколу не допускаются.

Статья

35

ВЫХОД

1. В любое время по истечении двух лет со дня вступления настоящего Протокола в силу для какой-либо Стороны эта Сторона может выйти из Протокола, направив письменное уведомление Депозитарию.

2. Такой выход вступает в силу по истечении одного года с даты получения уведомления Депозитарием или в такой более поздний срок, который может быть конкретно указан в уведомлении о выходе.

Статья

36

АУТЕНТИЧНЫЕ ТЕКСТЫ

Подлинник настоящего Протокола, тексты которого на английском, арабском, испанском, китайском, русском и французском языках являются равно аутентичными, сдается на хранение Генеральному секретарю Организации Объединенных Наций.

В УДОСТОВЕРЕНИЕ ЧЕГО нижеподписавшиеся, должным образом на то
уполномоченные, подписали настоящий Протокол в указанную дату.
СОВЕРШЕНО в Нагое двадцать девятого октября две тысячи десятого года.

Приложение

ДЕНЕЖНЫЕ И НЕДЕНЕЖНЫЕ ВЫГОДЫ

1. Денежные выгоды могут включать, но не ограничиваться ими:

- a) сборы за доступ/сбор за каждый собранный или иными способами приобретенный образец;
- b) авансовые выплаты;
- c) поэтапные выплаты;
- d) лицензионные платежи;
- e) лицензионные выплаты в случае коммерциализации;
- f) специальные взносы в целевые фонды поддержки сохранения и устойчивого использования биоразнообразия;
- g) зарплату и льготные условия в случае взаимной договоренности;
- h) финансирование научных исследований;
- i) совместные предприятия;
- j) совместное владение соответствующими правами интеллектуальной собственности.

2. Неденежные выгоды могут включать, но не ограничиваться ими:

- a) совместное использование результатов научных исследований и разработок;
- b) сотрудничество, совместную деятельность и внесение вклада в сфере осуществления программ научных исследований и развития, в частности реализации деятельности, связанной с исследованиями в области биотехнологий, по возможности в Стороне-поставщике;
- c) участие в разработке продуктов;
- d) сотрудничество, совместную деятельность и внесение вклада в области просвещения и подготовки кадров;
- e) доступ к объектам генетических ресурсов *ex-situ* и к базам данных;
- f) передачу поставщику генетических ресурсов, знаний и технологий на справедливых и наиболее благоприятных условиях, включая в частности, когда это согласовано, на льготных и преференциальных условиях, знаний и технологий, связанных с использованием генетических ресурсов, включая биотехнологию, или актуальных для сохранения и устойчивого использования биологического разнообразия;
- g) укрепление потенциала в области передачи технологий Сторонам-пользователям, являющимся развивающимися странами, и Сторонам, являющимся странами с

переходной экономикой, и разработку технологий в странах происхождения, которые предоставляют генетические ресурсы; кроме того, развитие возможностей коренных и местных общин в области сохранения и устойчивого использования их генетических ресурсов;

h) создание организационного потенциала;

i) людские и материальные ресурсы для укрепления потенциала в области применения и осуществления нормативных положений, регулирующих доступ к генетическим ресурсам;

j) профессиональную подготовку кадров в области генетических ресурсов при полном участии Сторон-поставщиков, причем, где это возможно, на территории таких Сторон;

k) доступ к научной информации, касающейся сохранения и устойчивого использования биологического разнообразия, в том числе проведение биологических инвентаризаций и таксономических исследований;

l) содействие развитию местной экономики;

m) научные исследования, направленные на удовлетворение первоочередных потребностей, таких как обеспечение надлежащего здравоохранения и воспроизводства продуктов питания, с учетом видов внутреннего использования генетических ресурсов в Странах-поставщиках;

n) организационные и профессиональные отношения, которые могут сложиться в результате заключения соглашения о доступе к генетическим ресурсам и совместном использовании выгод и последующей совместной деятельности;

o) выгоды, гарантирующие обеспеченность продовольствием и средства к существованию;

p) социальное признание;

q) совместное владение патентами и другими соответствующими формами прав интеллектуальной собственности.

**NAGOYA PROTOCOL
ON
ACCESS TO GENETIC RESOURCES
AND THE FAIR AND EQUITABLE
SHARING OF BENEFITS ARISING
FROM THEIR UTILIZATION
TO THE
CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY²**

TEXT AND ANNEX

**SECRETARIAT OF THE CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY
MONTREAL**

**Convention on Biological Diversity
United Nations**

² Nagoya Protocol on Access to Genetic Resources and the Fair and Equitable Sharing of Benefits Arising from their Utilization to the Convention on Biological Diversity: text and annex / Secretariat of the Convention on Biological Diversity. – Canada, 2011. – 26 p. – ISBN 92-9225-306-9

INTRODUCTION

The Convention on Biological Diversity was opened for signature on 5 June 1992 at the United Nations Conference on Environment and Development (the Rio “Earth Summit”) and entered into force on 29 December 1993. The Convention is the only international instrument comprehensively addressing biological diversity. The Convention’s three objectives are the conservation of biological diversity, the sustainable use of its components and the fair and equitable sharing of benefits arising from the utilisation of genetic resources.

To further advance the implementation of the third objective, the World Summit on Sustainable Development (Johannesburg, September 2002) called for the negotiation of an international regime, within the framework of the Convention, to promote and safeguard the fair and equitable sharing of benefits arising from the utilization of genetic resources. The Convention’s Conference of the Parties responded at its seventh meeting, in 2004, by mandating its Ad Hoc Open-ended Working Group on Access and Benefit-sharing to elaborate and negotiate an international regime on access to genetic resources and benefit-sharing in order to effectively implement Articles 15 (Access to Genetic Resources) and 8(j) (Traditional Knowledge) of the Convention and its three objectives.

After six years of negotiation, the Nagoya Protocol on Access to Genetic Resources and the Fair and Equitable Sharing of Benefits Arising from their Utilization to the Convention on Biological Diversity was adopted at the tenth meeting of the Conference of the Parties on 29 October 2010, in Nagoya, Japan.

The Protocol significantly advances the Convention’s third objective by providing a strong basis for greater legal certainty and transparency for both providers and users of genetic resources. Specific obligations to support compliance with domestic legislation or regulatory requirements of the Party providing genetic resources and contractual obligations reflected in mutually agreed terms are a significant innovation of the Protocol. These compliance provisions as well as provisions establishing more predictable conditions for access to genetic resources will contribute to ensuring the sharing of benefits when genetic resources leave a Party providing genetic resources. In addition, the Protocol’s provisions on access to traditional knowledge held by indigenous and local communities when it is associated with genetic resources will strengthen the ability of these communities to benefit from the use of their knowledge, innovations and practices.

By promoting the use of genetic resources and associated traditional knowledge, and by strengthening the opportunities for fair and equitable sharing of benefits from their use, the Protocol will create incentives to conserve biological diversity, sustainably use its components, and further enhance the contribution of biological diversity to sustainable development and human well-being.

NAGOYA PROTOCOL ON ACCESS TO GENETIC RESOURCES AND THE FAIR AND EQUITABLE SHARING OF BENEFITS ARISING FROM THEIR UTILIZATION TO THE CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY

The Parties to this Protocol,

Being Parties to the Convention on Biological Diversity, hereinafter referred to as “the Convention”,

Recalling that the fair and equitable sharing of benefits arising from the utilization of genetic resources is one of three core objectives of the Convention, and recognizing that this Protocol pursues the implementation of this objective within the Convention,

Reaffirming the sovereign rights of States over their natural resources and according to the provisions of the Convention,

Recalling further Article 15 of the Convention,

Recognizing the important contribution to sustainable development made by technology transfer and cooperation to build research and innovation capacities for adding value to genetic resources in developing countries, in accordance with Articles 16 and 19 of the Convention,

Recognizing that public awareness of the economic value of ecosystems and biodiversity and the fair and equitable sharing of this economic value with the custodians of biodiversity are key incentives for the conservation of biological diversity and the sustainable use of its components,

Acknowledging the potential role of access and benefit-sharing to contribute to the conservation and sustainable use of biological diversity, poverty eradication and environmental sustainability and thereby contributing to achieving the Millennium Development Goals,

Acknowledging the linkage between access to genetic resources and the fair and equitable sharing of benefits arising from the utilization of such resources,

Recognizing the importance of providing legal certainty with respect to access to genetic resources and the fair and equitable sharing of benefits arising from their utilization,

Further recognizing the importance of promoting equity and fairness in negotiation of mutually agreed terms between providers and users of genetic resources,

Recognizing also the vital role that women play in access and benefit-sharing and affirming the need for the full participation of women at all levels of policy-making and implementation for biodiversity conservation,

Determined to further support the effective implementation of the access and benefit-sharing provisions of the Convention,

Recognizing that an innovative solution is required to address the fair and equitable sharing of benefits derived from the utilization of genetic resources and traditional knowledge associated with genetic resources that occur in transboundary situations or for which it is not possible to grant or obtain prior informed consent,

Recognizing the importance of genetic resources to food security, public health, biodiversity conservation, and the mitigation of and adaptation to climate change,

Recognizing the special nature of agricultural biodiversity, its distinctive features and problems needing distinctive solutions,

Recognizing the interdependence of all countries with regard to genetic resources for food and agriculture as well as their special nature and importance for achieving food security worldwide and for sustainable development of agriculture in the context of poverty alleviation and climate change and acknowledging the fundamental role of the International Treaty on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture and the FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture in this regard,

Mindful of the International Health Regulations (2005) of the World Health Organization and the importance of ensuring access to human pathogens for public health preparedness and response purposes,

Acknowledging ongoing work in other international forums relating to access and benefit-sharing,

Recalling the Multilateral System of Access and Benefit-sharing established under the International Treaty on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture developed in harmony with the Convention,

Recognizing that international instruments related to access and benefit-sharing should be mutually supportive with a view to achieving the objectives of the Convention,

Recalling the relevance of Article 8(j) of the Convention as it relates to traditional knowledge associated with genetic resources and the fair and equitable sharing of benefits arising from the utilization of such knowledge,

Noting the interrelationship between genetic resources and traditional knowledge, their inseparable nature for indigenous and local communities, the importance of the traditional knowledge for the conservation of biological diversity and the sustainable use of its components, and for the sustainable livelihoods of these communities,

Recognizing the diversity of circumstances in which traditional knowledge associated with genetic resources is held or owned by indigenous and local communities,

Mindful that it is the right of indigenous and local communities to identify the rightful holders of their traditional knowledge associated with genetic resources, within their communities,

Further recognizing the unique circumstances where traditional knowledge associated with genetic resources is held in countries, which may be oral, documented or in other forms, reflecting a rich cultural heritage relevant for conservation and sustainable use of biological diversity,

Noting the United Nations Declaration on the Rights of Indigenous Peoples, and

Affirming that nothing in this Protocol shall be construed as diminishing or extinguishing the existing rights of indigenous and local communities,

Have agreed as follows:

Article

1

OBJECTIVE

The objective of this Protocol is the fair and equitable sharing of the benefits arising from the utilization of genetic resources, including by appropriate access to genetic resources and by appropriate transfer of relevant technologies, taking into account all rights over those resources and to technologies, and by appropriate funding, thereby contributing to the conservation of biological diversity and the sustainable use of its components.

Article

2

USE OF TERMS

The terms defined in Article 2 of the Convention shall apply to this Protocol. In addition, for the purposes of this Protocol:

- (a) “Conference of the Parties” means the Conference of the Parties to the Convention;
- (b) “Convention” means the Convention on Biological Diversity;
- (c) “Utilization of genetic resources” means to conduct research and development on the genetic and/or biochemical composition of genetic resources, including through the application of biotechnology as defined in Article 2 of the Convention;
- (d) “Biotechnology” as defined in Article 2 of the Convention means any technological application that uses biological systems, living organisms, or derivatives thereof, to make or modify products or processes for specific use;
- (e) “Derivative” means a naturally occurring biochemical compound resulting from the genetic expression or metabolism of biological or genetic resources, even if it does not contain functional units of heredity.

Article

3

SCOPE

This Protocol shall apply to genetic resources within the scope of Article 15 of the Convention and to the benefits arising from the utilization of such resources. This Protocol shall also apply to tradi-

tional knowledge associated with genetic resources within the scope of the Convention and to the benefits arising from the utilization of such knowledge.

Article

4

RELATIONSHIP WITH INTERNATIONAL AGREEMENTS AND INSTRUMENTS

1. The provisions of this Protocol shall not affect the rights and obligations of any Party deriving from any existing international agreement, except where the exercise of those rights and obligations would cause a serious damage or threat to biological diversity. This paragraph is not intended to create a hierarchy between this Protocol and other international instruments.
2. Nothing in this Protocol shall prevent the Parties from developing and implementing other relevant international agreements, including other specialized access and benefit-sharing agreements, provided that they are supportive of and do not run counter to the objectives of the Convention and this Protocol.
3. This Protocol shall be implemented in a mutually supportive manner with other international instruments relevant to this Protocol. Due regard should be paid to useful and relevant ongoing work or practices under such international instruments and relevant international organizations, provided that they are supportive of and do not run counter to the objectives of the Convention and this Protocol.
4. This Protocol is the instrument for the implementation of the access and benefit-sharing provisions of the Convention. Where a specialized international access and benefit-sharing instrument applies that is consistent with, and does not run counter to the objectives of the Convention and this Protocol, this Protocol does not apply for the Party or Parties to the specialized instrument in respect of the specific genetic resource covered by and for the purpose of the specialized instrument

Article

5

FAIR AND EQUITABLE BENEFIT-SHARING

1. In accordance with Article 15, paragraphs 3 and 7 of the Convention, benefits arising from the utilization of genetic resources as well as subsequent applications and commercialization shall be shared in a fair and equitable way with the Party providing such resources that is the country of origin of such resources or a Party that has acquired the genetic resources in accordance with the Convention. Such sharing shall be upon mutually agreed terms.

2. Each Party shall take legislative, administrative or policy measures, as appropriate, with the aim of ensuring that benefits arising from the utilization of genetic resources that are held by indigenous and local communities, in accordance with domestic legislation regarding the established rights of these indigenous and local communities over these genetic resources, are shared in a fair and equitable way with the communities concerned, based on mutually agreed terms.

3. To implement paragraph 1 above, each Party shall take legislative, administrative or policy measures, as appropriate.

4. Benefits may include monetary and non-monetary benefits, including but not limited to those listed in the Annex.

5. Each Party shall take legislative, administrative or policy measures, as appropriate, in order that the benefits arising from the utilization of traditional knowledge associated with genetic resources are shared in a fair and equitable way with indigenous and local communities holding such knowledge. Such sharing shall be upon mutually agreed terms.

Article

6

ACCESS TO GENETIC RESOURCES

1. In the exercise of sovereign rights over natural resources, and subject to domestic access and benefit-sharing legislation or regulatory requirements, access to genetic resources for their utilization shall be subject to the prior informed consent of the Party providing such resources that is the country of origin of such resources or a Party that has acquired the genetic resources in accordance with the Convention, unless otherwise determined by that Party.

2. In accordance with domestic law, each Party shall take measures, as appropriate, with the aim of ensuring that the prior informed consent or approval and involvement of indigenous and local communities is obtained for access to genetic resources where they have the established right to grant access to such resources.

3. Pursuant to paragraph 1 above, each Party requiring prior informed consent shall take the necessary legislative, administrative or policy measures, as appropriate, to:

- (a) Provide for legal certainty, clarity and transparency of their domestic access and benefit-sharing legislation or regulatory requirements;
- (b) Provide for fair and non-arbitrary rules and procedures on accessing genetic resources;
- (c) Provide information on how to apply for prior informed consent;
- (d) Provide for a clear and transparent written decision by a competent national authority, in a cost-effective manner and within a reasonable period of time;
- (e) Provide for the issuance at the time of access of a permit or its equivalent as evidence of the decision to grant prior informed consent and of the establishment of mutually agreed terms, and

notify the Access and Benefitsharing Clearing-House accordingly;

(f) Where applicable, and subject to domestic legislation, set out criteria and/or processes for obtaining prior informed consent or approval and involvement of indigenous and local communities for access to genetic resources; and

(g) Establish clear rules and procedures for requiring and establishing mutually agreed terms. Such terms shall be set out in writing and may include, inter alia:

- (i) A dispute settlement clause;
- (ii) Terms on benefit-sharing, including in relation to intellectual property rights;
- (iii) Terms on subsequent third-party use, if any; and
- (iv) Terms on changes of intent, where applicable.

Article

7

ACCESS TO TRADITIONAL KNOWLEDGE ASSOCIATED WITH GENETIC RESOURCES

In accordance with domestic law, each Party shall take measures, as appropriate, with the aim of ensuring that traditional knowledge associated with genetic resources that is held by indigenous and local communities is accessed with the prior and informed consent or approval and involvement of these indigenous and local communities, and that mutually agreed terms have been established.

Article

8

SPECIAL CONSIDERATIONS

In the development and implementation of its access and benefit-sharing legislation or regulatory requirements, each Party shall:

- (a) Create conditions to promote and encourage research which contributes to the conservation and sustainable use of biological diversity, particularly in developing countries, including through simplified measures on access for non-commercial research purposes, taking into account the need to address a change of intent for such research;
- (b) Pay due regard to cases of present or imminent emergencies that threaten or damage human, animal or plant health, as determined nationally or internationally. Parties may

take into consideration the need for expeditious access to genetic resources and expeditious fair and equitable sharing of benefits arising out of the use of such genetic resources, including access to affordable treatments by those in need, especially in developing countries;

(c) Consider the importance of genetic resources for food and agriculture and their special role for food security.

Article

9

CONTRIBUTION TO CONSERVATION AND SUSTAINABLE USE

The Parties shall encourage users and providers to direct benefits arising from the utilization of genetic resources towards the conservation of biological diversity and the sustainable use of its components.

Article

10

GLOBAL MULTILATERAL BENEFIT-SHARING MECHANISM

Parties shall consider the need for and modalities of a global multilateral benefitsharing mechanism to address the fair and equitable sharing of benefits derived from the utilization of genetic resources and traditional knowledge associated with genetic resources that occur in transboundary situations or for which it is not possible to grant or obtain prior informed consent. The benefits shared by users of genetic resources and traditional knowledge associated with genetic resources through this mechanism shall be used to support the conservation of biological diversity and the sustainable use of its components globally.

Article

11

TRANSBOUNDARY COOPERATION

1. In instances where the same genetic resources are found *in situ* within the territory of more than one Party, those Parties shall endeavour to cooperate, as appropriate, with the involvement of indigenous and local communities concerned, where applicable, with a view to implementing this Protocol.

2. Where the same traditional knowledge associated with genetic resources is shared by one or more indigenous and local communities in several Parties, those Parties shall endeavour to cooperate, as appropriate, with the involvement of the indigenous and local communities concerned, with a view to implementing the objective of this Protocol.

Article

12

TRADITIONAL KNOWLEDGE ASSOCIATED WITH GENETIC RESOURCES

1. In implementing their obligations under this Protocol, Parties shall in accordance with domestic law take into consideration indigenous and local communities' customary laws, community protocols and procedures, as applicable, with respect to traditional knowledge associated with genetic resources.
2. Parties, with the effective participation of the indigenous and local communities concerned, shall establish mechanisms to inform potential users of traditional knowledge associated with genetic resources about their obligations, including measures as made available through the Access and Benefit-sharing Clearing-House for access to and fair and equitable sharing of benefits arising from the utilization of such knowledge.
3. Parties shall endeavour to support, as appropriate, the development by indigenous and local communities, including women within these communities, of:
 - (a) Community protocols in relation to access to traditional knowledge associated with genetic resources and the fair and equitable sharing of benefits arising out of the utilization of such knowledge;
 - (b) Minimum requirements for mutually agreed terms to secure the fair and equitable sharing of benefits arising from the utilization of traditional knowledge associated with genetic resources; and
 - (c) Model contractual clauses for benefit-sharing arising from the utilization of traditional knowledge associated with genetic resources.
4. Parties, in their implementation of this Protocol, shall, as far as possible, not restrict the customary use and exchange of genetic resources and associated traditional knowledge within and amongst indigenous and local communities in accordance with the objectives of the Convention.

Article

13

NATIONAL FOCAL POINTS AND COMPETENT NATIONAL AUTHORITIES

1. Each Party shall designate a national focal point on access and benefit-sharing.

The national focal point shall make information available as follows:

- (a) For applicants seeking access to genetic resources, information on procedures for obtaining prior informed consent and establishing mutually agreed terms, including benefit-sharing;
- (b) For applicants seeking access to traditional knowledge associated with genetic resources, where possible, information on procedures for obtaining prior informed consent or approval and involvement, as appropriate, of indigenous and local communities and establishing mutually agreed terms including benefit-sharing; and
- (c) Information on competent national authorities, relevant indigenous and local communities and relevant stakeholders.

The national focal point shall be responsible for liaison with the Secretariat.

2. Each Party shall designate one or more competent national authorities on access and benefit-sharing. Competent national authorities shall, in accordance with applicable national legislative, administrative or policy measures, be responsible for granting access or, as applicable, issuing written evidence that access requirements have been met and be responsible for advising on applicable procedures and requirements for obtaining prior informed consent and entering into mutually agreed terms.
3. A Party may designate a single entity to fulfil the functions of both focal point and competent national authority.
4. Each Party shall, no later than the date of entry into force of this Protocol for it, notify the Secretariat of the contact information of its national focal point and its competent national authority or authorities. Where a Party designates more than one competent national authority, it shall convey to the Secretariat, with its notification thereof, relevant information on the respective responsibilities of those authorities. Where applicable, such information shall, at a minimum, specify which competent authority is responsible for the genetic resources sought. Each Party shall forthwith notify the Secretariat of any changes in the designation of its national focal point or in the contact information or responsibilities of its competent national authority or authorities.
5. The Secretariat shall make information received pursuant to paragraph 4 above available through the Access and Benefit-sharing Clearing-House.

Article

14

THE ACCESS AND BENEFIT-SHARING CLEARING-HOUSE AND INFORMATION-SHARING

1. An Access and Benefit-sharing Clearing-House is hereby established as part of the clearing-house mechanism under Article 18, paragraph 3, of the Convention. It shall serve as a means for sharing of information related to access and benefitsharing. In particular, it shall provide access to information made available by each Party relevant to the implementation of this Protocol.

2. Without prejudice to the protection of confidential information, each Party shall make available to the Access and Benefit-sharing Clearing-House any information required by this Protocol, as well as information required pursuant to the decisions taken by the Conference of the Parties serving as the meeting of the Parties to this Protocol. The information shall include:

- (a) Legislative, administrative and policy measures on access and benefit-sharing;
- (b) Information on the national focal point and competent national authority or authorities; and
- (c) Permits or their equivalent issued at the time of access as evidence of the decision to grant prior informed consent and of the establishment of mutually agreed terms.

3. Additional information, if available and as appropriate, may include:

- (a) Relevant competent authorities of indigenous and local communities, and information as so decided;
- (b) Model contractual clauses;
- (c) Methods and tools developed to monitor genetic resources; and
- (d) Codes of conduct and best practices.

4. The modalities of the operation of the Access and Benefit-sharing ClearingHouse, including reports on its activities, shall be considered and decided upon by the Conference of the Parties serving as the meeting of the Parties to this Protocol at its first meeting, and kept under review thereafter.

Article

15

COMPLIANCE WITH DOMESTIC LEGISLATION OR REGULATORY REQUIREMENTS ON ACCESS AND BENEFIT-SHARING

1. Each Party shall take appropriate, effective and proportionate legislative, administrative or policy measures to provide that genetic resources utilized within its jurisdiction have been accessed in accordance with prior informed consent and that mutually agreed terms have been established, as required by the domestic access and benefit-sharing legislation or regulatory requirements of the other Party.
2. Parties shall take appropriate, effective and proportionate measures to address situations of non-compliance with measures adopted in accordance with paragraph 1 above.
3. Parties shall, as far as possible and as appropriate, cooperate in cases of alleged violation of domestic access and benefit-sharing legislation or regulatory requirements referred to in paragraph 1 above.

Article

16

COMPLIANCE WITH DOMESTIC LEGISLATION OR REGULATORY REQUIREMENTS ON ACCESS AND BENEFIT SHARING FOR TRADITIONAL KNOWLEDGE ASSOCIATED WITH GENETIC RESOURCES

1. Each Party shall take appropriate, effective and proportionate legislative, administrative or policy measures, as appropriate, to provide that traditional knowledge associated with genetic resources utilized within their jurisdiction has been accessed in accordance with prior informed consent or approval and involvement of indigenous and local communities and that mutually agreed terms have been established, as required by domestic access and benefit-sharing legislation or regulatory requirements of the other Party where such indigenous and local communities are located.
2. Each Party shall take appropriate, effective and proportionate measures to address situations of non-compliance with measures adopted in accordance with paragraph 1 above.
3. Parties shall, as far as possible and as appropriate, cooperate in cases of alleged violation of domestic access and benefit-sharing legislation or regulatory requirements referred to in paragraph 1 above.

Article

17

MONITORING THE UTILIZATION OF GENETIC RESOURCES

1. To support compliance, each Party shall take measures, as appropriate, to monitor and to enhance transparency about the utilization of genetic resources. Such measures shall include:
 - (a) The designation of one or more checkpoints, as follows:
 - (i) Designated checkpoints would collect or receive, as appropriate, relevant information related to prior informed consent, to the source of the genetic resource, to the establishment of mutually agreed terms, and/or to the utilization of genetic resources, as appropriate;
 - (ii) Each Party shall, as appropriate and depending on the particular characteristics of a designated checkpoint, require users of genetic resources to provide the information specified in the above paragraph at a designated checkpoint. Each Party shall take appropriate, effective and proportionate measures to address situations of non-compliance;
 - (iii) Such information, including from internationally recognized certificates of compliance where they are available, will, without prejudice to the protection of confidential information, be provided to relevant national authorities, to the Party providing prior informed consent and to the Access and Benefit-sharing Clearing-House, as appropriate;
 - (iv) Checkpoints must be effective and should have functions relevant to implementation of

this subparagraph (a). They should be relevant to the utilization of genetic resources, or to the collection of relevant information at, inter alia, any stage of research, development, innovation, pre-commercialization or commercialization.

(b) Encouraging users and providers of genetic resources to include provisions in mutually agreed terms to share information on the implementation of such terms, including through reporting requirements; and

(c) Encouraging the use of cost-effective communication tools and systems.

2. A permit or its equivalent issued in accordance with Article 6, paragraph 3 (e) and made available to the Access and Benefit-sharing Clearing-House, shall constitute an internationally recognized certificate of compliance.

3. An internationally recognized certificate of compliance shall serve as evidence that the genetic resource which it covers has been accessed in accordance with prior informed consent and that mutually agreed terms have been established, as required by the domestic access and benefit-sharing legislation or regulatory requirements of the Party providing prior informed consent.

4. The internationally recognized certificate of compliance shall contain the following minimum information when it is not confidential:

(a) Issuing authority;

(b) Date of issuance;

(c) The provider;

(d) Unique identifier of the certificate;

(e) The person or entity to whom prior informed consent was granted;

(f) Subject-matter or genetic resources covered by the certificate;

(g) Confirmation that mutually agreed terms were established;

(h) Confirmation that prior informed consent was obtained; and

(i) Commercial and/or non-commercial use.

Article

18

COMPLIANCE WITH MUTUALLY AGREED TERMS

1. In the implementation of Article 6, paragraph 3 (g) (i) and Article 7, each Party shall encourage providers and users of genetic resources and/or traditional knowledge associated with genetic resources to include provisions in mutually agreed terms to cover, where appropriate, dispute resolution including:

- (a) The jurisdiction to which they will subject any dispute resolution processes;
 - (b) The applicable law; and/or
 - (c) Options for alternative dispute resolution, such as mediation or arbitration.
2. Each Party shall ensure that an opportunity to seek recourse is available under their legal systems, consistent with applicable jurisdictional requirements, in cases of disputes arising from mutually agreed terms.
3. Each Party shall take effective measures, as appropriate, regarding:
- (a) Access to justice; and
 - (b) The utilization of mechanisms regarding mutual recognition and enforcement of foreign judgments and arbitral awards.
4. The effectiveness of this article shall be reviewed by the Conference of the Parties serving as the meeting of the Parties to this Protocol in accordance with Article 31 of this Protocol.

Article

19

MODEL CONTRACTUAL CLAUSES

1. Each Party shall encourage, as appropriate, the development, update and use of sectoral and cross-sectoral model contractual clauses for mutually agreed terms.
2. The Conference of the Parties serving as the meeting of the Parties to this Protocol shall periodically take stock of the use of sectoral and cross-sectoral model contractual clauses.

Article

20

CODES OF CONDUCT, GUIDELINES AND BEST PRACTICES AND/OR STANDARDS

1. Each Party shall encourage, as appropriate, the development, update and use of voluntary codes of conduct, guidelines and best practices and/or standards in relation to access and benefit-sharing.
2. The Conference of the Parties serving as the meeting of the Parties to this Protocol shall periodically take stock of the use of voluntary codes of conduct, guidelines and best practices and/or standards and consider the adoption of specific codes of conduct, guidelines and best practices and/or standards.

Article**21****AWARENESS-RAISING**

Each Party shall take measures to raise awareness of the importance of genetic resources and traditional knowledge associated with genetic resources, and related access and benefit-sharing issues. Such measures may include, inter alia:

- (a) Promotion of this Protocol, including its objective;
- (b) Organization of meetings of indigenous and local communities and relevant stakeholders;
- (c) Establishment and maintenance of a help desk for indigenous and local communities and relevant stakeholders;
- (d) Information dissemination through a national clearing-house;
- (e) Promotion of voluntary codes of conduct, guidelines and best practices and/or standards in consultation with indigenous and local communities and relevant stakeholders;
- (f) Promotion of, as appropriate, domestic, regional and international exchanges of experience;
- (g) Education and training of users and providers of genetic resources and traditional knowledge associated with genetic resources about their access and benefit-sharing obligations;
- (h) Involvement of indigenous and local communities and relevant stakeholders in the implementation of this Protocol; and
- (i) Awareness-raising of community protocols and procedures of indigenous and local communities.

Article**22****CAPACITY**

1. The Parties shall cooperate in the capacity-building, capacity development and strengthening of human resources and institutional capacities to effectively implement this Protocol in developing country Parties, in particular the least developed countries and small island developing States among them, and Parties with economies in transition, including through existing global, regional, subregional and national institutions and organizations. In this context, Parties should facilitate the involvement of indigenous and local communities and relevant stakeholders, including non-governmental organizations and the private sector.

2. The need of developing country Parties, in particular the least developed countries and small island developing States among them, and Parties with economies in transition for financial resour-

ces in accordance with the relevant provisions of the Convention shall be taken fully into account for capacity-building and development to implement this Protocol.

3. As a basis for appropriate measures in relation to the implementation of this Protocol, developing country Parties, in particular the least developed countries and small island developing States among them, and Parties with economies in transition should identify their national capacity needs and priorities through national capacity self-assessments. In doing so, such Parties should support the capacity needs and priorities of indigenous and local communities and relevant stakeholders, as identified by them, emphasizing the capacity needs and priorities of women.

4. In support of the implementation of this Protocol, capacity-building and development may address, inter alia, the following key areas:

- (a) Capacity to implement, and to comply with the obligations of, this Protocol;
- (b) Capacity to negotiate mutually agreed terms;
- (c) Capacity to develop, implement and enforce domestic legislative, administrative or policy measures on access and benefit-sharing; and
- (d) Capacity of countries to develop their endogenous research capabilities to add value to their own genetic resources.

5. Measures in accordance with paragraphs 1 to 4 above may include, inter alia:

- (a) Legal and institutional development;
- (b) Promotion of equity and fairness in negotiations, such as training to negotiate mutually agreed terms;
- (c) The monitoring and enforcement of compliance;
- (d) Employment of best available communication tools and Internet-based systems for access and benefit-sharing activities;
- (e) Development and use of valuation methods;
- (f) Bioprospecting, associated research and taxonomic studies;
- (g) Technology transfer, and infrastructure and technical capacity to make such technology transfer sustainable;
- (h) Enhancement of the contribution of access and benefit-sharing activities to the conservation of biological diversity and the sustainable use of its components;
- (i) Special measures to increase the capacity of relevant stakeholders in relation to access and benefit-sharing; and
- (j) Special measures to increase the capacity of indigenous and local communities with emphasis on enhancing the capacity of women within those communities in relation to access to genetic resources and/or traditional knowledge associated with genetic resources.

6. Information on capacity-building and development initiatives at national, regional and international levels, undertaken in accordance with paragraphs 1 to 5 above, should be provided to the

Access and Benefit-sharing Clearing-House with a view to promoting synergy and coordination on capacity-building and development for access and benefit-sharing.

Article

23

TECHNOLOGY TRANSFER, COLLABORATION AND COOPERATION

In accordance with Articles 15, 16, 18 and 19 of the Convention, the Parties shall collaborate and cooperate in technical and scientific research and development programmes, including biotechnological research activities, as a means to achieve the objective of this Protocol. The Parties undertake to promote and encourage access to technology by, and transfer of technology to, developing country Parties, in particular the least developed countries and small island developing States among them, and Parties with economies in transition, in order to enable the development and strengthening of a sound and viable technological and scientific base for the attainment of the objectives of the Convention and this Protocol. Where possible and appropriate such collaborative activities shall take place in and with a Party or the Parties providing genetic resources that is the country or are the countries of origin of such resources or a Party or Parties that have acquired the genetic resources in accordance with the Convention.

Article

24

NON-PARTIES

The Parties shall encourage non-Parties to adhere to this Protocol and to contribute appropriate information to the Access and Benefit-sharing Clearing-House.

Article

25

FINANCIAL MECHANISM AND RESOURCES

1. In considering financial resources for the implementation of this Protocol, the Parties shall take into account the provisions of Article 20 of the Convention.
2. The financial mechanism of the Convention shall be the financial mechanism for this Protocol.
3. Regarding the capacity-building and development referred to in Article 22 of this Protocol, the Conference of the Parties serving as the meeting of the Parties to this Protocol, in providing guid-

ance with respect to the financial mechanism referred to in paragraph 2 above, for consideration by the Conference of the Parties, shall take into account the need of developing country Parties, in particular the least developed countries and small island developing States among them, and of Parties with economies in transition, for financial resources, as well as the capacity needs and priorities of indigenous and local communities, including women within these communities.

4. In the context of paragraph 1 above, the Parties shall also take into account the needs of the developing country Parties, in particular the least developed countries and small island developing States among them, and of the Parties with economies in transition, in their efforts to identify and implement their capacity-building and development requirements for the purposes of the implementation of this Protocol.

5. The guidance to the financial mechanism of the Convention in relevant decisions of the Conference of the Parties, including those agreed before the adoption of this Protocol, shall apply, *mutatis mutandis*, to the provisions of this Article.

6. The developed country Parties may also provide, and the developing country Parties and the Parties with economies in transition avail themselves of, financial and other resources for the implementation of the provisions of this Protocol through bilateral, regional and multilateral channels.

Article

26

CONFERENCE OF THE PARTIES SERVING AS THE MEETING OF THE PARTIES TO THIS PROTOCOL

1. The Conference of the Parties shall serve as the meeting of the Parties to this Protocol.
2. Parties to the Convention that are not Parties to this Protocol may participate as observers in the proceedings of any meeting of the Conference of the Parties serving as the meeting of the Parties to this Protocol. When the Conference of the Parties serves as the meeting of the Parties to this Protocol, decisions under this Protocol shall be taken only by those that are Parties to it.
3. When the Conference of the Parties serves as the meeting of the Parties to this Protocol, any member of the Bureau of the Conference of the Parties representing a Party to the Convention but, at that time, not a Party to this Protocol, shall be substituted by a member to be elected by and from among the Parties to this Protocol.
4. The Conference of the Parties serving as the meeting of the Parties to this Protocol shall keep under regular review the implementation of this Protocol and shall make, within its mandate, the decisions necessary to promote its effective implementation. It shall perform the functions assigned to it by this Protocol and shall:
 - (a) Make recommendations on any matters necessary for the implementation of this Protocol;
 - (b) Establish such subsidiary bodies as are deemed necessary for the implementation of this Protocol;
 - (c) Seek and utilize, where appropriate, the services and cooperation of, and information provided

by, competent international organizations and intergovernmental and non-governmental bodies;

(d) Establish the form and the intervals for transmitting the information to be submitted in accordance with Article 29 of this Protocol and consider such information as well as reports submitted by any subsidiary body;

(e) Consider and adopt, as required, amendments to this Protocol and its Annex, as well as any additional annexes to this Protocol, that are deemed necessary for the implementation of this Protocol; and

(f) Exercise such other functions as may be required for the implementation of this Protocol.

5. The rules of procedure of the Conference of the Parties and financial rules of the Convention shall be applied, *mutatis mutandis*, under this Protocol, except as may be otherwise decided by consensus by the Conference of the Parties serving as the meeting of the Parties to this Protocol.

6. The first meeting of the Conference of the Parties serving as the meeting of the Parties to this Protocol shall be convened by the Secretariat and held concurrently with the first meeting of the Conference of the Parties that is scheduled after the date of the entry into force of this Protocol. Subsequent ordinary meetings of the Conference of the Parties serving as the meeting of the Parties to this Protocol shall be held concurrently with ordinary meetings of the Conference of the Parties, unless otherwise decided by the Conference of the Parties serving as the meeting of the Parties to this Protocol.

7. Extraordinary meetings of the Conference of the Parties serving as the meeting of the Parties to this Protocol shall be held at such other times as may be deemed necessary by the Conference of the Parties serving as the meeting of the Parties to this Protocol, or at the written request of any Party, provided that, within six months of the request being communicated to the Parties by the Secretariat, it is supported by at least one third of the Parties.

8. The United Nations, its specialized agencies and the International Atomic Energy Agency, as well as any State member thereof or observers thereto not party to the Convention, may be represented as observers at meetings of the Conference of the Parties serving as the meeting of the Parties to this Protocol. Any body or agency, whether national or international, governmental or non-governmental, that is qualified in matters covered by this Protocol and that has informed the Secretariat of its wish to be represented at a meeting of the Conference of the Parties serving as a meeting of the Parties to this Protocol as an observer, may be so admitted, unless at least one third of the Parties present object. Except as otherwise provided in this Article, the admission and participation of observers shall be subject to the rules of procedure, as referred to in paragraph 5 above.

Article

27

SUBSIDIARY BODIES

1. Any subsidiary body established by or under the Convention may serve this Protocol, including upon a decision of the Conference of the Parties serving as the meeting of the Parties to this Protocol. Any such decision shall specify the tasks to be undertaken.

2. Parties to the Convention that are not Parties to this Protocol may participate as observers in the proceedings of any meeting of any such subsidiary bodies. When a subsidiary body of the Convention serves as a subsidiary body to this Protocol, decisions under this Protocol shall be taken only by Parties to this Protocol.

3. When a subsidiary body of the Convention exercises its functions with regard to matters concerning this Protocol, any member of the bureau of that subsidiary body representing a Party to the Convention but, at that time, not a Party to this Protocol, shall be substituted by a member to be elected by and from among the Parties to this Protocol.

Article

28

SECRETARIAT

1. The Secretariat established by Article 24 of the Convention shall serve as the secretariat to this Protocol.

2. Article 24, paragraph 1, of the Convention on the functions of the Secretariat shall apply, *mutatis mutandis*, to this Protocol.

3. To the extent that they are distinct, the costs of the secretariat services for this Protocol shall be met by the Parties hereto. The Conference of the Parties serving as the meeting of the Parties to this Protocol shall, at its first meeting, decide on the necessary budgetary arrangements to this end.

Article

29

MONITORING AND REPORTING

Each Party shall monitor the implementation of its obligations under this Protocol, and shall, at intervals and in the format to be determined by the Conference of the Parties serving as the meeting of the Parties to this Protocol, report to the Conference of the Parties serving as the meeting of the Parties to this Protocol on measures that it has taken to implement this Protocol.

Article

30

PROCEDURES AND MECHANISMS TO PROMOTE COMPLIANCE WITH THIS PROTOCOL

The Conference of the Parties serving as the meeting of the Parties to this Protocol shall, at its first meeting, consider and approve cooperative procedures and institutional mechanisms to promote

compliance with the provisions of this Protocol and to address cases of non-compliance. These procedures and mechanisms shall include provisions to offer advice or assistance, where appropriate. They shall be separate from, and without prejudice to, the dispute settlement procedures and mechanisms under Article 27 of the Convention.

Article

31

ASSESSMENT AND REVIEW

The Conference of the Parties serving as the meeting of the Parties to this Protocol shall undertake, four years after the entry into force of this Protocol and thereafter at intervals determined by the Conference of the Parties serving as the meeting of the Parties to this Protocol, an evaluation of the effectiveness of this Protocol.

Article

32

SIGNATURE

This Protocol shall be open for signature by Parties to the Convention at the United Nations Headquarters in New York, from 2 February 2011 to 1 February 2012

Article

33

ENTRY INTO FORCE

1. This Protocol shall enter into force on the ninetieth day after the date of deposit of the fiftieth instrument of ratification, acceptance, approval or accession by States or regional economic integration organizations that are Parties to the Convention.
2. This Protocol shall enter into force for a State or regional economic integration organization that ratifies, accepts or approves this Protocol or accedes thereto after the deposit of the fiftieth instrument as referred to in paragraph 1 above, on the ninetieth day after the date on which that State or regional economic integration organization deposits its instrument of ratification, acceptance, approval or accession, or on the date on which the Convention enters into force for that State or regional economic integration organization, whichever shall be the later.

3. For the purposes of paragraphs 1 and 2 above, any instrument deposited by a regional economic integration organization shall not be counted as additional to those deposited by member States of such organization.

Article

34

RESERVATIONS

No reservations may be made to this Protocol.

Article

35

WITHDRAWAL

1. At any time after two years from the date on which this Protocol has entered into force for a Party, that Party may withdraw from this Protocol by giving written notification to the Depository.
2. Any such withdrawal shall take place upon expiry of one year after the date of its receipt by the Depository, or on such later date as may be specified in the notification of the withdrawal.

Article

36

AUTHENTIC TEXTS

The original of this Protocol, of which the Arabic, Chinese, English, French, Russian and Spanish texts are equally authentic, shall be deposited with the Secretary-General of the United Nations.

IN WITNESS WHEREOF the undersigned, being duly authorized to that effect, have signed this Protocol on the dates indicated.

DONE at Nagoya on this twenty-ninth day of October, two thousand and ten.

Annex**MONETARY AND NON-MONETARY BENEFITS**

1. Monetary benefits may include, but not be limited to:
 - (a) Access fees/fee per sample collected or otherwise acquired;
 - (b) Up-front payments;
 - (c) Milestone payments;
 - (d) Payment of royalties;
 - (e) Licence fees in case of commercialization;
 - (f) Special fees to be paid to trust funds supporting conservation and sustainable use of biodiversity;
 - (g) Salaries and preferential terms where mutually agreed;
 - (h) Research funding;
 - (i) Joint ventures;
 - (j) Joint ownership of relevant intellectual property rights.
2. Non-monetary benefits may include, but not be limited to:
 - (a) Sharing of research and development results;
 - (b) Collaboration, cooperation and contribution in scientific research and development programmes, particularly biotechnological research activities, where possible in the Party providing genetic resources;
 - (c) Participation in product development;
 - (d) Collaboration, cooperation and contribution in education and training;
 - (e) Admittance to ex situ facilities of genetic resources and to databases;
 - (f) Transfer to the provider of the genetic resources of knowledge and technology under fair and most favourable terms, including on concessional and preferential terms where agreed, in particular, knowledge and technology that make use of genetic resources, including biotechnology, or that are relevant to the conservation and sustainable utilization of biological diversity;
 - (g) Strengthening capacities for technology transfer;
 - (h) Institutional capacity-building;
 - (i) Human and material resources to strengthen the capacities for the administration and enforcement of access regulations;
 - (j) Training related to genetic resources with the full participation of countries providing genetic resources, and where possible, in such countries;
 - (k) Access to scientific information relevant to conservation and sustainable use of biological diversity, including biological inventories and taxonomic studies;

- (l) Contributions to the local economy;
- (m) Research directed towards priority needs, such as health and food security, taking into account domestic uses of genetic resources in the Party providing genetic resources;
- (n) Institutional and professional relationships that can arise from an access and benefit-sharing agreement and subsequent collaborative activities;
- (o) Food and livelihood security benefits;
- (p) Social recognition;
- (q) Joint ownership of relevant intellectual property rights.

РЕФЕРАТЫ

SUMMARIES

УДК 577.21

Кильчевский, А.В. Развитие геномных биотехнологий в Республике Беларусь: достижения и перспективы / А.В. Кильчевский, В.А. Лемеш, Е.А. Сычева // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 18. – Минск, 2014. – С. 7–19.

В обзоре рассмотрены тенденции развития, основные направления и современное состояние дел в сфере геномных биотехнологий в Беларуси. Большое внимание уделено проблеме их практического использования в народном хозяйстве. Освещены перспективы и возможные меры по развитию работ в данной области.

Ключевые слова: геномные биотехнологии, маркер-ассоциированная селекция, ДНК-паспортизация, трансгенез, ДНК-диагностика генетической предрасположенности к заболеваниям человека, ДНК-тестирование спортсменов, биобанк ДНК.

Kilcheuski, A.V. Development of Genomic Biotechnologies in the Republic of Belarus: Achievements and Prospects / A.V. Kilcheuski, V.A. Lemesh, Ye.A. Sycheva // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 18. – Minsk, 2014. – P. 7–19.

Trends of development and contemporary situation in the area of genomic biotechnologies in Belarus are analyzed in the review. The great attention is given to the problem of their practical use in the national economy. Prospects and possible measures for development of investigations in this field are elucidated.

Key words: genomic biotechnologies, marker assisted selection, DNA certification, transgenesis, DNA-diagnostics of genetic predisposition to human diseases, DNA-testing of sportsmen, DNA biobank.

УДК 633.521:581.4:604.6

Генетическая трансформация льна / В.А. Лемеш [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 18. – Минск, 2014. – С. 20–30. – Соавт.: Е.В. Гузенко, Т.Е. Саматадзе, Е.В. Железнякова, Н.Л. Большева, О.В. Муравенко.

Несмотря на определенные успехи в области генетической трансформации льна, получение стабильно воспроизводимых трансгенных линий до сих пор остается трудноразрешимой задачей, что делает особенно актуальным изучение особенностей создания, развития и репродукции ГМ линий данной сельскохозяйственной культуры. Представлены результаты агробактериальной и биобаллистической трансформации льна-долгунца, а также результаты морфобиологических и молекулярно-генетических исследований растений «ложных трансформантов» льна.

Ключевые слова: генетическая трансформация, лен, химерный ген *gfp-tua6*, «ложные трансформанты».

Genetic Transformation of Flax / V.A. Lemesh [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 18. – Minsk, 2014. – P. 20–30. – Ye.V. Guzenko, T.Ye. Samatadze, Ye.V. Zheleznyakova, N.L. Bolsheva, O.V. Muravenko.

In spite of a certain progress in the field of flax genetic transformation, production of consistently reproducible transgenic lines still remains a difficult problem to be solved that makes it especially important to study features of development and reproduction of GM-lines of this agricultural crop. The results of agrobacterial and bioballistic transformation of fiber flax as well as those of morphobiological and molecular-genetic studies of flax “escapes” are presented.

Key words: genetic transformation, flax, chimeric gene *gfp-tua6*, “escapes”.

УДК 574.3:575.24/.25]:616.151.5

Моссэ, И.Б. Генетическая диагностика – неотъемлемая часть персональной и превентивной медицины / И.Б. Моссэ // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 18. – Минск, 2014. – С. 31–43.

Медицина будущего – персонализированная, предиктивная, превентивная, партисипативная – основана на применении ДНК-диагностики, позволяющей выявлять молекулярно-генетические факторы риска мультифакториальных заболеваний. Разработаны технологии определения генетической предрасположенности к сердечно-сосудистым заболеваниям, диабету, метаболическому синдрому, остеопорозу, невынашиванию беременности. Своевременное выявление высокого риска данных патологий позволяет предупреждать их развитие.

Ключевые слова: ДНК-диагностика, инфаркт миокарда, кардиометаболический синдром, остеопороз, невынашивание беременности, генетические маркеры риска.

Mosse, I.B. Genetic Diagnostics – an Integral Part of Personal and Preventive Medicine / I.B. Mosse // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 18. – Minsk, 2014. – P. 31–43.

Future medicine will be personalized, predictive, preventive and participative, based on DNA-diagnostics, which allows detection of molecular-genetic risk factors of multifactorial diseases. The technologies were elaborated for identification of genetic predisposition to cardiovascular diseases, diabetes, metabolic syndrome, osteoporosis, and pregnancy miscarriage. Timely detection of a high risk of the above pathologies allows prevention of their development.

Key words: DNA-diagnostics, myocardial infarction, cardiometabolic syndrome, diabetes, osteoporosis, pregnancy miscarriage, genetic risk markers.

УДК 577.21:575:616.62-006.6

Полиморфизм генов эксцизионной репарации ДНК как дополнительный фактор прогрессии рака мочевого пузыря: исследование на пациентах Беларуси / Н.В. Савина [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 18. – Минск, 2014. – С. 44–52. – Соавт.: Н.В. Никитченко, О.П. Романюк, Т.Д. Кужир, А.Л. Поляков, А.И. Ролевич, С.А. Красный, Р.И. Гончарова.

Представлены результаты генотипирования образцов ДНК, полученных от 336 пациентов в возрасте от 31 года до 88 лет с установленным диагнозом рака мочевого пузыря (РМП) по полиморфизму генов эксцизионной репарации *XPD* Asp312Asn, *XRCC1* Arg399Gln, *OGG1* Ser326Cys и *ERCC6* Met1097Val. Проанализировано распределение частот генотипов и аллелей перечисленных генов в зависимости от стадии (Т) и степени дифференцировки (G) опухоли. Обнаружено статистически значимое повышение частоты аллеля Asp гена *XPD* (кодон 312) в подгруппе пациентов с РМП Т4 по сравнению с опухолями Та/Т1, что может указывать на ассоциацию этого аллеля с прогрессией рака. Установлена сходная закономерность для минорного аллеля Cys гена *OGG1* (кодон 326) при рецидивах заболевания. Проблема поиска дополнительных прогностических маркеров, модифицирующих прогрессию рака, среди генов, ответственных за репарацию ДНК, требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: эксцизионная репарация ДНК, полиморфизм генов *XPD*, *XRCC1*, *OGG1*, *ERCC6*; рак мочевого пузыря, прогрессия.

Polymorphism of Excision Repair Genes as an Additional Factor of Bladder Cancer Progression: the Study in the Patients of Belarus / N.V. Savina [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 18. – Minsk, 2014. – P. 44–52. – N.V. Nikitchenko, O.P. Ramaniuk, T.D. Kuzhir, A.L. Polyakov, A.I. Rolevich, S.A. Krasny, R.I. Goncharova.

The results of genotyping DNA samples collected from 336 patients aged from 31 to 88 years with verified diagnosis of bladder cancer (BC) for *XPD* Asp312Asn, *XRCC1* Arg399Gln, *OGG1* Ser326Cys and *ERCC6* Met1097Val excision repair gene polymorphisms are presented. The distribution of genotypic/allelic frequencies for the listed genes has been analyzed depending on

tumor stages T and grades G. The statistically significant increase in the frequency of the variant Asn of the *XPD* (codon 312) gene has been found in the subgroup of patients with the tumor stage T4 as compared to Ta/T1. The results might indicate association of this polymorphism with cancer progression. The similar association has been observed for the minor allele Cys of the *OGG1* (codon 326) gene in recurrences of disease. The problem of screening the additional prognostic markers modifying the cancer progression among the genes responsible for DNA repair requires further study.

Key words: excision repair, *XPD*, *XRCC1*, *OGG1*, *ERCC6* gene polymorphisms, bladder cancer, progression.

УДК 575.858:582.542.1:631.523.55:631.527.5

Дубовец, Н.И. Микроэволюционная дифференциация полиплоидных видов злаков путем формирования рекомбинантных геномов / Н.И. Дубовец, Е.А. Сычева // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 18. – Минск, 2014. – С. 53–60.

Впервые изучен в динамике процесс микроэволюционной дифференциации полиплоидных видов злаков путем формирования рекомбинантных геномов и выявлены закономерности стабилизации рекомбинантного генома. Установлено, что процесс взаимозамещения хромосом исходных гаплоидных геномов происходит не случайным образом, а подчинен давлению отбора. Отбор идет на уровне гомеологов, селективные преимущества которых определяются генотип-средовыми взаимодействиями. Когда гомеолог обладает явными селективными преимуществами, стабилизация хромосомного состава соответствующей гомеологической группы заканчивается быстро, что приводит к образованию межгеномных рекомбинаций на уровне целых хромосом. Если конкурентоспособность гомеологов одинакова, скорость стабилизации состава группы замедляется. При этом доминирование генетических систем базового генома обеспечивает высокий уровень спаривания в мейозе гомеологических хромосом рекомбинантного генома и, как следствие этого, образование рекомбинаций на уровне сегментов хромосом. Показано, что в различных условиях произрастания отбираются разные варианты сочетаний хромосом исходных геномов.

Ключевые слова: полиплоидные злаки, микроэволюционная дифференциация, рекомбинантный геном, базовый геном, межгеномные рекомбинации, кроссоверные обмены.

Dubovets, N.I. Microevolutionary Differentiation of Cereals Polyploid Species by Recombinant Genome Formation / N.I. Dubovets, Ye.A. Sycheva // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 18. – Minsk, 2014. – P. 53–60.

The process of microevolutionary differentiation in cereals polyploid species by forming recombinant genomes was studied for the first time in dynamics, and the stabilization mechanisms of the recombinant genome have been identified. It has been found that mutual chromosome substitution of the original haploid genomes is subjected to selection pressure and, hence, is nonrandom. The selection occurs at the level of homeologues, whose selective advantages are determined by genotype-environment interactions. If a homeologue has distinct selective advantages, the chromosome composition stabilization of the corresponding homeologous group is completed rapidly that leads to formation of intergenomic recombinations at the level of whole chromosomes. If homeologues have the same competitiveness, the stabilization rate of the group composition becomes slower. Domination of the genetic systems of the basic genome ensures a high pairing rate of homeologous chromosomes of the recombinant genome during meiosis that leads to recombinations at the level of chromosome segments. It has been demonstrated that different combinations of chromosomes from the original genomes are selected under different growing conditions.

Key words: polyploid cereals, microevolutionary differentiation, recombinant genome, basic genome, intergenomic recombinations, crossover exchanges.

УДК 577.11:633.11

Использование SSR-маркеров для характеристики гибридных линий мягкой пшеницы с генетическим материалом *T. durum* и *T. dicoccum* / И.Н. Леонова [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 18. – Минск, 2014. – С. 61–69. – Соавт.: Е.А. Салина, О.А. Орловская, Л.В. Хотылева, В.К. Шумный.

Проведено генотипирование коллекции гибридных линий мягкой пшеницы, полученных с участием тетраплоидных видов *T. durum* и *T. dicoccum*, с помощью хромосом-специфичных микросателлитных (SSR) маркеров. Анализ родительских форм на полиморфизм *Xgwm*, *Xgdm* и *Xwmc* микросателлитных локусов с известной локализацией на хромосомах А, В и D мягкой пшеницы *T. aestivum* показал, что более 80% маркеров являются полиморфными. Генотипирование полиморфными маркерами выявило в геноме гибридных линий от 4 до 12 фрагментов *T. durum* и *T. dicoccum* различной протяженности в хромосомах А и В геномов. Проверка хромосом генома D с помощью D-геном-специфичных микросателлитных маркеров не обнаружила фрагментов интрогрессий в этих хромосомах. Полученные данные выявили различия в частотах интрогрессий генетического материала тетраплоидных пшениц в хромосомы мягкой пшеницы. Результаты генотипирования в сочетании с полученными ранее данными кариотипирования методом С-окрашивания хромосом свидетельствуют об отсутствии делеций и негомеологичных транслокаций в геноме гибридных линий.

Ключевые слова: мягкая пшеница *T. aestivum*, тетраплоидные виды пшеницы *T. durum* и *T. dicoccum*, интрогрессивные линии, генотипирование, SSR-маркеры.

Characterization of Common Wheat Hybrid Lines with *T. durum* and *T. dicoccum* Genetic Material by SSR Markers / I.N. Leonova [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 18. – Minsk, 2014. – P. 61–69. – E.A. Salina, O.A. Orlovskaya, L.V. Khotyleva, V.K. Shumny.

The collection of hybrid lines produced by crossing common wheat with tetraploid wheat species *T. durum* и *T. dicoccum* was genotyped by chromosome-specific microsatellite (SSR) markers. Analysis of parental forms with *Xgwm*, *Xgdm* and *Xwmc* microsatellite markers with known localization on chromosomes A, B and D of common wheat *T. aestivum*, has shown that more than 80% of markers were polymorphic. Genotyping of hybrid lines with polymorphic markers has identified from 4 to 12 genomic fragments of *T. durum* and *T. dicoccum* differing in length in A and B chromosomes. Analysis of D genome chromosomes with D-genome-specific SSR markers has not detected introgressed fragments in these chromosomes. The obtained data have revealed differences in the introgression frequencies of tetraploid wheat genetic material into the common wheat chromosomes. The results of genotyping in combination with the karyotyping data obtained earlier by C-banding indicate lack of deletions and nonhomoeologous translocations in the genome of hybrid lines.

Key words: common wheat *T. aestivum*, tetraploid wheat species *T. durum* and *T. dicoccum*, introgressive lines, genotyping, SSR markers.

УДК 577.21:575.17:599.735.5(476)

Михайлова, М.Е. Оценка генетической структуры беловежского зубра (*Bison bonasus* L.) по одиночным нуклеотидным заменам генов *DRB3* и *DQB* главного комплекса гистосовместимости / М.Е. Михайлова, Ю.В. Войтюховская // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 18. – Минск, 2014. – С. 70–76.

Показаны различия в генетической структуре белорусской и польской популяций беловежского зубра по SNP-заменам генов *DRB3* и *DQB* главного комплекса гистосовместимости (МНС), участвующих в реализации иммунного ответа. Выявлены уникальные и редкие аллели, которые являются ценными для популяции и будут способствовать увеличению генетического разнообразия и повышению жизнеспособности вида.

Ключевые слова: беловежский зубр, *Bison bonasus*, частота генов *DRB3* и *DQB*, главный комплекс гистосовместимости.

Mikhailova, M.Ye. Evaluation of Genetic Structure of European Bison (*Bison bonasus* L.) by a Single Nucleotide Polymorphism Genes *DRB3* and *DQB* of Major Histocompatibility Complex (MHC) / M.Ye. Mikhailova, Yu. V. Voytyukhovskaya // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 18. – Minsk, 2014. – P. 70–76.

Differences were shown in the genetic structure of the Belarusian and Polish populations of European bison for SNP-substitutions of genes *DRB3* and *DQB* of the major histocompatibility complex (MHC), involved in the immune response implementation. Unique and rare alleles, which are valuable for the population and will contribute to an increase in genetic diversity and the species viability, were identified.

Key words: European bison, frequency of genes *DRB3* and *DQB*, major histocompatibility complex.

УДК 616-006.88:599

Исследование эффектов рекомбинантного лактоферрина человека на пролиферацию и апоптоз раковых и иммортализованных клеток / Я.И. Шейко [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 18. – Минск, 2014. – С. 77–83. – Соавт.: О.В. Квитко, И.И. Конева, Н.А. Балашенко, А.И. Бudevич, С.Е. Дромашко.

Лактоферрин – регуляторный белок, наиболее высокая концентрация которого наблюдается в молоке. Анализ литературы демонстрирует неоднозначность действия лактоферрина на разные типы клеток, вплоть до противоположных эффектов. Накоплены данные об участии этого белка в целом ряде процессов на клеточном и организменном уровне. Сообщается также об участии этого белка в регуляции иммунитета, в частности, в подавлении патогенных микроорганизмов и опухолевого роста. В данной работе изучено воздействие различных концентраций рекомбинантного лактоферрина из молока трансгенных коз на пролиферацию и апоптоз клеток линии рака легкого A549 и иммортализованной линии эмбриональных фибробластов человека. В культурах клеток рака легкого A549 после одно- и двукратного введения лактоферрина не было обнаружено достоверного влияния на темп пролиферации клеток. В культурах иммортализованной линии эмбриональных фибробластов человека при трехкратном введении лактоферрина в концентрациях 100 и 1000 мкг/мл уменьшал количество клеток, причем ингибирующий эффект возрастал при повышении концентрации препарата вплоть до полной гибели клеток.

Ключевые слова: лактоферрин, культура клеток, пролиферация, антираковая защита, прижизненная видеомикроскопия.

Study on Effects of Recombinant Human Lactoferrin on Proliferation and Apoptosis of Cancer and Immortalized Cells / Y.I. Sheiko [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 18. – Minsk, 2014. – P. 77–83. – O.V. Kvitko, I.I. Koneva, N.A. Balashenko, A.I. Budevich, S.E. Dromashko.

Lactoferrin is a regulatory protein with the highest concentration in milk. The analysis of the literature demonstrates the ambiguous picture of lactoferrin effects on different cell types. The data reveal involvement of this protein in a number of processes at the cellular and organismal level. Involvement of this protein in regulation of immunity, particularly in inhibition of pathogenic organisms and tumor growth is also reported. In this study, the effects of various concentrations of the recombinant lactoferrin from milk of transgenic goats on proliferation and apoptosis of the lung cancer cell line A549 and the immortalized line of human embryonic fibroblasts were studied. In cell cultures of A549 lung carcinoma, lactoferrin did not change the rate of cell proliferation after one- and two-fold application. In cell cultures of the immortalized line of human embryonic fibroblasts, lactoferrin at 100 and 1000 µg/ml reduced the number of cells after three-fold application, and this inhibitory effect increased with increasing concentration up to cell death.

Key words: lactoferrin, cell culture, proliferation, apoptosis, anticancer defense, intravital videomicroscopy.

УДК 577.21:004.02:004.94

ChIP-seq данные и их анализ / Ю.Л. Орлов [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 18. – Минск, 2014. – С. 84–97. – Соавт.: Г.В. Васильев, Е.В. Кулакова, Н.А. Колчанов.

Появление высокопроизводительных экспериментальных технологий секвенирования привело к бурному росту объема данных о структуре генома, распределении регуляторных районов генов в геноме, особенностях их взаимодействия. Данная статья представляет обзор технологий, связанных с иммунопреципитацией хроматина и последующим секвенированием (ChIP-seq). Описаны компьютерные методы анализа сайтов связывания транскрипционных факторов и структуры регуляторных районов в масштабе генома. Представлены подходы к решению задач, возникающих при аннотации геномных данных, определении сайтов связывания транскрипционных факторов и регуляторных районов.

Ключевые слова: секвенирование, иммунопреципитация хроматина, геном, сайты связывания транскрипционных факторов, регуляция экспрессии генов, ChIP-seq, ChIA-PET.

CHIP-seq Data and Their Analysis / Y.L. Orlov [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 18. – Minsk, 2014. – P. 84–97. – G.V. Vasiliev, E.V. Kulakova, N.A. Kolchanov.

Development of highly productive experimental sequencing technologies has led to rapid growth of data amount on the genome structure, distribution of gene regulatory regions in genome and features of their interactions. This work reviews technologies related to chromatin immunoprecipitation followed by DNA sequencing (ChIP-seq). It describes computer methods of binding sites analysis of transcription factors and patterns of regulatory regions on a genome scale. The approaches are presented to solve the problems encountered during annotation of genomic data, detection of binding sites of transcription factors and regulatory regions.

Key words: sequencing, chromatin immunoprecipitation, genome, transcription factor binding sites, gene expression regulation, ChIP-seq, ChIA-PET.

УДК 576.316.24 : 599

Рубцов, Н.Б. Морфофункциональная организация теломер млекопитающих / Н.Б. Рубцов, Ю.М. Минина, Н.С. Жданова // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 18. – Минск, 2014. – С. 98–117.

На концах хромосом локализованы специализированные нуклеопротеиновые структуры – теломеры. Теломеры представляют собой повторенную последовательность (TTAGGG)_n на отстающей в ходе репликации нити, которая заканчивается одностранным концом, образующим петлевою структуру, запечатывающую конец хромосомы. Кроме того, теломеры содержат комплекс shelterin из 6 белковых компонентов, стабилизирующих теломеры и регулирующих в них гомологичную и нехомологичную рекомбинацию. Теломеры предохраняют концы хромосомы от деградации и слияния хромосом концами. В обзоре рассматриваются вопросы, связанные с функционированием теломер в диплоидных, перевиваемых и опухолевых клетках млекопитающих и с последствиями для клетки теломерной дисфункции. Обсуждается роль теломер в пространственной организации ядра, а также возможность эволюционного подхода к изучению морфофункциональной организации теломер у разных видов млекопитающих. Большую роль в определении судьбы клеток играет длина теломер и то, с помощью каких механизмов она поддерживается. Возможно ли сосуществование в клетках, в том числе диплоидных, разных способов поддержания длины теломер: с помощью теломеразы и рекомбинационных механизмов.

Ключевые слова: теломера, млекопитающие, теломераза, альтернативное удлинение теломер.

Rubtsov, N.B. Morphofunctional Organization of Mammalian Telomeres / N.B. Rubtsov, J.M. Minina, N.S. Zhdanova // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 18. – Minsk, 2014. – P. 98–117.

Telomeres are specialized nucleoprotein structures localized on the chromosome ends. Telomeres are repeated sequence TTAGGG on the lagging DNA strand. This strand is ended by single-stranded

3' overhang that develops t-loop preserving chromosomes from undesirable DNA recombination and repair machinery. The protein telomere complex shelterin contains six components that play a major role in telomere structure stabilization and regulation of homologous and nonhomologous recombination. Telomeres preserve chromosome ends from degradation and end-to-end fusion. The review deals with the issues related to telomere functioning in diploid, long-term culturing and tumoral cells and aftereffects of telomere dysfunction. We discuss the role of telomeres in spatial nucleus architecture, and the possibility of evolutionary approach to the study of morphofunctional organization of telomeres in different mammalian species. The telomere length and the mechanisms maintaining it play a major role in determining the cell fate. Is there the coexistence of different ways for maintaining the telomere length in cells including diploid ones: by means of telomerase and recombination mechanisms?

Key words: telomere, mammals, telomerase, alternative telomere lengthening.

УДК 636.93

Трапезов, О.В. Генетические основы одомашнивания / О.В. Трапезов // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 18. – Минск, 2014. – С. 118–132.

В конце 50-х–начале 60-х годов XX века под руководством академика Д.К. Беляева на модельных объектах клеточного пушного звероводства был предложен оригинальный подход, позволяющий ускорить темпы одомашнивания, соизмерив их с продолжительностью человеческой жизни, и благодаря этому увидеть исходные моменты в одомашнивающих преобразованиях диких животных. Эволюционно-генетической школой Беляева показано, что стрессовые воздействия могут ускорять темп как одомашнивающих, так и эволюционных преобразований путем повышения изменчивости в популяциях.

Ключевые слова: Д.К. Беляев, эволюционно-генетическая школа, одомашнивание, селекция, стрессоустойчивость.

Trapezov, O.V. Genetic Bases of Domestication / O.V. Trapezov // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 18. – Minsk, 2014. – P. 118–132.

In the late fifties, early sixties experimental simulation of the historical process on domestication of fur-bearing animals, which were bred in captivity at special fur farms, was started under the guidance of the Russian geneticist Dmitry Belyaev and an original method, enabling acceleration of the domestication rate, was proposed. Owing to this fact original moments in domestication changes of wild animals were observed. Belyaev's evolutionary-genetic school has shown that stress effects can accelerate the rate of both domestication and evolutionary changes by increasing the variability in populations.

Key words: D.K. Belyaev, evolutionary-genetic school, domestication, breeding, stress-resistance.

УДК 575.23-024.1

Серов, О.Л. Трансгенез как эффективный способ модификации геномов животных / О.Л. Серов // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 18. – Минск, 2014. – С. 133–142.

Прошло немногим более 30 лет с того момента, когда была создана технология введения чужеродных рекомбинантных генов, или искусственных генно-инженерных конструкций, в геном животных, получившая название трансгенез животных. За это время появились многие сотни и даже тысячи публикаций, описывающих молекулярные механизмы интеграции чужеродной рекомбинантной или геномной ДНК в реципиентный геном различных видов животных. Исследования трансгенеза развивались в двух направлениях: в фундаментальном, главным образом, для изучения механизмов генной регуляции на молекулярном и клеточном уровнях, и параллельно разрабатывались прикладные аспекты трансгенеза животных либо в качестве биореакторов-продуцентов ценных белков, либо для повышения резистентности самих трансгенных животных к вирусной, микробной и грибковой инфекциям. Данный обзор посвящен достижениям и перспективам развития технологий получения трансгенных животных для фундаментальных и прикладных целей.

Ключевые слова: трансгенез, экспрессия трансгенов, гены-репортеры, трансгенные животные как биореакторы.

Serov, O.L. Transgenesis as an Effective Approach of Animal Modification / O.L. Serov // *Molecular and Applied Genetics: Proceedings.* – Vol. 18. – Minsk, 2014. – P. 133–142.

About 30 years ago the technology for introducing alien recombinant genes or artificial genetic engineering constructions into animal genome was developed. It was called transgenesis of animals. In the past decades there were many hundreds or even thousands publications describing molecular mechanisms of integration of foreign genomic or recombinant DNA into the recipient genomes of various animal species. Transgenesis investigations were conducted in two directions: towards fundamental aspects, primarily to study mechanisms of gene regulation at molecular and cellular levels, and at the same time to develop applied aspects of transgenesis of animals as bioreactors producing valuable proteins or for increasing resistance of transgenic animals to viral, microbial and fungous infections. This review focuses on achievements and prospects of the technology development for producing transgenic animals for basic and applied purposes.

Key words: transgenesis, transgene expression, reporter gene, transgenic animals as bioreactors.

УДК 616-037-076.5

Максимов, В.Н. Роль исследования ДНК в оценке индивидуального риска развития болезни / В.Н. Максимов, М.И. Воевода, Ю.В. Максимова // *Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр.* – Т. 18. – Минск, 2014. – С. 143–147.

Необходимость оценки риска развития заболевания у пробанда или риска повторного случая заболевания в семье является постоянной в практике врача-генетика и рассматривается собственно как одна из главных целей медико-генетического консультирования. Внедрение в клиническую практику методов исследования ДНК сопряжено с рядом трудностей, которые обсуждаются в статье.

Ключевые слова: индивидуальный риск, популяция, NGS, GWAS, SNP.

Maximov, V.N. The Role of DNA Testing in the Assessment of Individual Risk of Developing the Disease / V.N. Maximov, M.I. Voevoda, J.V. Maximova // *Molecular and Applied Genetics: Proceedings.* – Vol. 18. – Minsk, 2014. – P. 143–147.

The need to assess the risk of the disease development in the proband or the risk of disease recurrence in the family is constant in the practice of a medical-geneticist and considered one of the main goals of medicogenetic counseling. Introduction of the DNA research methods into clinical practice entails a number of difficulties, which are discussed in the article.

Key words: individual risk, population, NGS, GWAS, SNP.

УДК 569.9:572.1:575.1:575.8

Пилипенко, А.С. Палеогенетика: происхождение человека и этногенетические реконструкции / А.С. Пилипенко // *Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр.* – Т. 18. – Минск, 2014. – С. 148–159.

В статье рассмотрено современное состояние одного из ключевых направлений палеогенетики – молекулярно-генетических исследований останков человека различного возраста. Уделено внимание специфическим особенностям выполнения палеогенетических исследований антропологического материала. Проведен обзор наиболее интересных работ, посвященных исследованию останков древних людей эпохи позднего плейстоцена и их роли в формировании современных представлений о формировании генофонда современного населения планеты. Представлена оценка современного состояния исследований в области этногенетических реконструкций, основанных на палеогенетическом останков древних людей эпохи голоцена. Обсуждаются перспективы дальнейшего развития палеогенетики человека.

Ключевые слова: палеогенетика, древняя ДНК, гоминиды, анатомически современный человек, плейстоцен, голоцен, геном, этногенетические реконструкции, высокопроизводительные методы секвенирования ДНК.

Pilipenko, A.S. Paleogenetics: Human Origin and Ethnogenetic Reconstructions / A.S. Pilipenko // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 18. – Minsk, 2014. – P. 148–159.

The article considers the current status of one of the key paleogenetics trend – molecular-genetic studies of human remains of different ages. Attention is paid to the specific features of paleogenetic research implementation of anthropological material. The most interesting studies on the ancient people remains of the late Pleistocene and their role in forming modern conceptions about the gene pool of the current world population were reviewed. The current status of research in ethnogenetic reconstructions based on paleogenetic remains of ancient people from Holocene epoch was assessed. The prospects of further development of human paleogenetics are discussed.

Keywords: paleogenetics, ancient DNA, hominids, anatomically modern human, Pleistocene, Holocene, genome, ethnogenetic reconstructions, high-productive DNA sequencing methods.

УДК 9.515

Макеева, Е.Н. Нагойский протокол – международный механизм регулирования использования генетических ресурсов / Е.Н. Макеева, Н.В. Минченко // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 18. – Минск, 2014. – С. 162–166.

В статье рассматриваются основные положения Нагойского протокола регулирования доступа к генетическим ресурсам и совместного использования на справедливой и равной основе выгод от их применения к Конвенции ООН о биологическом разнообразии и вопросы практического применения Нагойского протокола как международного правового документа по защите прав собственников генетических ресурсов на получение выгод от использования этих ресурсов заинтересованными субъектами хозяйствования. Эффективность данных международных соглашений определяет дальнейшие перспективы международного сотрудничества стран, направленного на сохранение разнообразия живой природы и его устойчивого использования в интересах человечества. Республика Беларусь представлена в бюро Секретариата Конвенции о биологическом разнообразии (Минченко Н.В.) и в Комитете по соблюдению Нагойского протокола при Секретариате Конвенции о биологическом разнообразии (Макеева Е.Н.).

Ключевые слова: биологическое разнообразие, генетические ресурсы, Конвенция о биологическом разнообразии, Нагойский протокол.

Makeyeva, E.N. The Nagoya Protocol – International Mechanism for Regulation of Genetic Resources Use / E.N. Makeyeva, N.V. Minchenko // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 18. – Minsk, 2014. – P. 162–166.

The article deals with basic provisions of the Nagoya Protocol on Access to Genetic Resources and the Fair and Equitable Sharing of Benefits Arising from their Utilization and their practical use for protection of the suppliers' rights to genetic resources for benefits arising from those resources utilization by stakeholders. The efficiency of the mentioned international treaties is emphasized to determine the further prospects of international country collaboration aimed at conservation of wild-life diversity for human well-being.

Keywords: biological diversity, genetic resources, Convention on Biological Diversity, The Nagoya Protocol

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЬИ

Статьи должны быть написаны в сжатой и ясной форме и содержать:

- соответствующий индекс универсальной десятичной классификации литературы (УДК);
- название на русском и английском языках;
- инициалы и фамилии авторов на русском и английском языках;
- полное название учреждений, в которых выполнялось исследование и их почтовые адреса;
- ключевые слова (3...5 слов);
- аннотацию на русском и английском языках (ок). Аннотация должна ясно излагать содержание статьи и быть пригодной для опубликования в аннотациях к журналам отдельно от статьи;
- текст статьи (стандартизировать, используя подзаголовки «Введение», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение»);
- список использованных источников (оформляется в соответствии с Правилами ВАК, Приложение 2);
- дату поступления статьи в редакцию.

Объем статьи должен составлять не менее 14 000 знаков, включая пробелы, до 10–12 страниц. Рекомендуемый средний объем аннотации – 500 знаков с пробелами. После распечатки статья должна быть вычитана автором (авторами). На последней ее странице должна(ы) быть подпись(и) автора(ов). Текст статьи идентичного содержания представляется в электронном виде (по e-mail или на дискете) и на бумажном носителе в 2 экз. В виде отдельного документа представляются краткие сведения о каждом из авторов, включающие фамилию, имя, отчество, год рождения, сведения об образовании, служебные адреса, адрес электронной почты, ученую степень, ученое звание, должность, область научных интересов. Необходимо представить АКТ ЭКСПЕРТИЗЫ о возможности опубликования открытой печати (для статей).

1. Сдаваемый документ должен быть представлен в электронном виде в формате MS-Word. Название файлов – фамилия первого автора латинскими буквами.

2. Формат бумаги А4 (210×297 мм), ориентация – книжная.

3. Поля: верхнее – 2,5 см, нижнее – 2,5 см, левое – 2,5 см, правое – 2,5 см.

4. Основной текст статьи набирается шрифтом Times New Roman, размером 12 пт, в одну колонку с одинарным межстрочным интервалом. Не допускается использование табуляции или пробелов для обозначения первой строки абзаца.

5. Автоматическая расстановка переносов обязательна.

6. Название статьи набирать полужирным начертанием шрифта по центру. Переносы в заголовках не допускаются.

7. Все таблицы, содержащиеся в документе, должны быть реализованы средствами работы с таблицами редактора MS-Word. Не допускается вложение таблиц, созданных в других программах. Таблицы и графики должны быть пронумерованы и иметь названия. Не допускается размещение таблиц и рисунков в конце статьи (непосредственно перед списком литературы).

8. Вставка в текст символов (например, β , ϵ) производится только через опцию «Вставка\Символ». Выключку вверх и вниз (C^2 , C_4) выполнять через меню «Формат\Шрифт\Верхний индекс\Нижний индекс». Греческие символы должны быть прямыми, латинские буквы набираются *курсивом*. Математические формулы (\lim , \sum , \sin , и т.д.) и цифры набираются прямым начертанием.

9. Печатать в сложных словах дефис (минерал-индикатор, К-пространство). Тире отбивают с обеих сторон неразрывным пробелом как знак препинания между словами: система «человек — машина», «май — июнь». Тире между цифрами, напр., 20–30 чел. — не отбивается.

10. Кавычки по всему тексту должны быть одного «рисунка». Кавычки не отбивают от заключенных в них слов.

11. При подготовке к печати графиков, блок-схем, диаграмм, файлы должны быть поименованы таким образом, чтобы было понятно, к какой статье они принадлежат и какими по порядку рисунками статьи являются. Графики должны иметь толщину всех линий не менее 0,2 пункта для четкого воспроизведения. Все надписи на рисунках должны быть набраны на компьютере и сгруппированы с рисунком, не допускается использование сканированного текста.

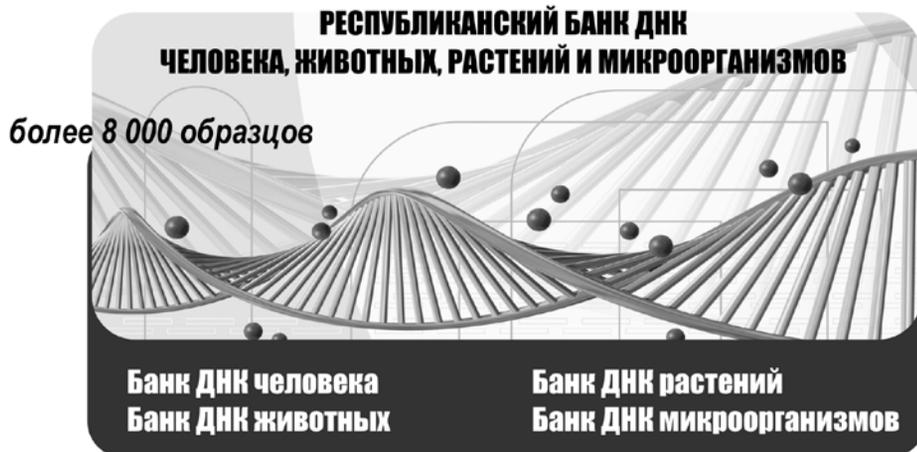
12. Необходимо предоставить электронные файлы фотоматериалов, а также распечатки лазерным принтером всех иллюстраций на листе формата А4. Отсканированные фотоиллюстрации серой, черно-белой цветовой модели должны иметь разрешение 600 dpi и формат TIFF.

13. Список цитированных источников располагается в конце текста, ссылки нумеруются согласно порядку цитирования в тексте. Порядковые номера ссылок д.б. написаны внутри квадратных скобок. (напр.: [1]).



Государственное научное учреждение «ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И ЦИТОЛОГИИ НАН БЕЛАРУСИ»

РЕСПУБЛИКАНСКИЙ БАНК ДНК человека, животных, растений и микроорганизмов создан для длительного качественного хранения и многократного использования уникальных образцов ДНК для разработки и внедрения геномных биотехнологий в здравоохранении, спорте, охране окружающей среды, промышленности и сельском хозяйстве.



Во всем мире расширяется применение геномных биотехнологий в медицине, спорте, экологии, сельском хозяйстве и промышленности. Эффективность разработки и внедрения прорывных геномных биотехнологий может быть существенно повышена благодаря использованию генетического материала, который сохраняется в банках ДНК.

НАЗНАЧЕНИЕ РЕСПУБЛИКАНСКОГО БАНКА ДНК

- для взаимовыгодного обмена в рамках международных договоров, регулирующих обмен генетическими ресурсами, таких как Конвенция о биологическом разнообразии и Нагойский протокол регулирования доступа к генетическим ресурсам и совместного использования на справедливой и равной основе выгод от их применения
- для разработки методов генной диагностики заболеваний в целях развития персонализированной и профилактической медицины, решения проблем криминалистики и этногеномики;
- для получения информации об индивидуальных возможностях спортсменов с целью подбора режима тренировок, питания и фармакологической поддержки, разработки программ отбора и профессиональной ориентации начинающих спортсменов;
- для разработки методов геномной селекции с целью сокращения сроков и повышения эффективности селекционного процесса по признакам продуктивности, устойчивости и качества продукции, сохранения и расширения национального генофонда, решения природоохранных проблем;
- для решения задач пищевой промышленности и биотехнологического производства;
- для сохранения генетического материала редких и исчезающих видов животных и растений.



ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
220072, Республика Беларусь, г. Минск, ул. Академическая, 27
Тел.: (+375 17) 284-19-18, 284-04-11 Факс: (+375 17) 284-19-17
E-mail: office@igc.bas-net.by сайт: www.gens.by



Научное издание

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ

Том 18

Ответственный за выпуск *И.В. Широкая*
Переводчик *Г.А. Мартысь*
Верстка *Е.А. Клевец*
Корректор *И.В. Широкая*
Технический редактор *Е.А. Клевец*

Подписано в печать 17.10.2014. Формат 60×84 ¹/₈. Бумага офсетная. Гарнитура Times.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 27,9. Уч.изд. л. 17,91. Тираж 100 экз. Заказ № 3568
Отпечатано в типографии ООО «Поликрафт»
ЛП № 02330/0494199 от 03.04.2009
220103, г. Минск, ул. Кнорина, 50, корп. 4

Оригинал-макет подготовлен ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/51 от 08.10.2013 г.
220072, г. Минск, ул. Академическая, 27