

Письма

в

**ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ
ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ**

Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding

2021
ДЕКАБРЬ

Обзоры • Оригинальные статьи • Воспоминания

Том 7
№4

PISMAVAVILOV@BIONET.NSC.RU

ПИСЬМА В ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Научный рецензируемый журнал
Лисьма



ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 2015 году
 Периодичность четыре раза в год
 DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-20

Учредитель

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН)

Главный редактор

А.В. Кочетов – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия)

Заместители главного редактора

Н.П. Гончаров – академик РАН, д-р биол. наук (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия)

Е.А. Салина – д-р биол. наук, профессор (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия)

Ответственный секретарь

О.Ю. Шоева – канд. биол. наук (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия)

Редакционная коллегия

О.С. Афанасенко – академик РАН, д-р биол. наук, профессор (Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия)

М.А. Вишнякова – д-р биол. наук, профессор (Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Россия)

Т.А. Гавриленко – д-р биол. наук, профессор (Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Россия)

Ю.Э. Гербек – канд. биол. наук (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия)

Е.И. Гултыяева – д-р биол. наук (Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия)

Н.И. Дубовец – чл.-кор. НАН Беларуси, д-р биол. наук, доцент (Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь)

И.К. Захаров – д-р биол. наук, профессор (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия)

К.В. Крутовский – канд. биол. наук, профессор (Гёттингенский университет им. Георга-Августа, Гёттинген, Германия)

А.М. Кудрявцев – д-р биол. наук (Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия)

С.А. Лашин – канд. биол. наук (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия)

А.Ю. Летягин – д-р мед. наук, профессор (НИИКЭЛ – филиал СО РАН, Новосибирск, Россия)

П.Н. Мальчиков – д-р с.-х. наук (Самарский НИИ сельского хозяйства им. Н.М. Тулайкова, пос. Безенчук, Россия)

Е.А. Орлова – канд. с.-х. наук (СибНИИРС – филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия)

А.С. Пилипенко – канд. биол. наук (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия)

Ю.И. Рагино – чл.-кор. РАН, д-р мед. наук, профессор (НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия)

И.Д. Рашаль – академик Латвийской АН, д-р биол. наук, профессор (Институт биологии Латвийского университета, Саласпилс, Латвия)

Р.Р. Садоян – д-р биол. наук, доцент (Армянский государственный педагогический университет им. Хачатура Абовяна, Ереван, Армения)

А.А. Соловьев – д-р биол. наук, профессор (Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия)

Н.А. Сурин – академик РАН, д-р с.-х. наук, профессор (Федеральный исследовательский центр КНЦ СО РАН – обособленное подразделение Красноярский НИИ сельского хозяйства, Россия)

В.А. Трифонов – д-р биол. наук, профессор (Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия)

В.С. Фишман – канд. биол. наук (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия)

С.В. Шеховцов – канд. биол. наук (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия)

Scientific Peer Reviewed Journal

Letters

to **VAVILOV JOURNAL
OF GENETICS AND BREEDING**

Founded in 2015

Published four times a year

DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-20

Founder

Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences (ICG SB RAS)

Editor-in-Chief

A.V. Kochetov – Dr. Sci. in Biol., Corr. Member of the RAS (Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia)

Deputy Editors-in-Chief

N.P. Goncharov – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia)

E.A. Salina – Dr. Sci. in Biol., Professor (Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia)

Executive Secretary

O.Yu. Shoeva – Cand. Sci. in Biol. (Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia)

Editorial board

O.S. Afanasenko – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS Professor (All-Russia Research Institute for Plant Protection, St. Petersburg, Russia)

M.A. Vishnyakova – Dr. Sci. in Biol., Professor (N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, Russia)

T.A. Gavrilenko – Dr. Sci. in Biol., Professor (N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, Russia)

Yu.E. Herbeck – Cand. Sci. in Biol. (Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia)

E.I. Gulyaeva – Dr. Sci. in Biol. (All-Russia Research Institute for Plant Protection, St. Petersburg, Russia)

N.I. Dubovets – Dr. Sci. in Biol., Corr. Member of the NASB, Docent (Institute of Genetics and Cytology of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus)

I.K. Zakharov – Dr. Sci. in Biol., Professor (Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia)

K.V. Krutovsky – Cand. Sci. in Biol., Professor (Georg-August University of Göttingen, Göttingen, Germany)

A.M. Kudryavtsev – Dr. Sci. in Biol. (Vavilov Institute of General Genetics, RAS, Moscow, Russia)

S.A. Lashin – Cand. Sci. in Math. Biol. Bioinf. (Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia)

A.Y. Letyagin – Dr. Sci. in Med., Professor (Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia)

P.N. Malchikov – Dr. Sci. in Agricul. (Tulaikov Research Institute of Agriculture, Russian Agricultural Academy, Bezenchuk, Russia)

E.A. Orlova – Cand. Sci. in Agricul. (Siberian Research Institute of Plant Production and Breeding – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia)

A.S. Pilipenko – Cand. Sci. in Biol. (Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia)

Yu.I. Ragino – Dr. Sci. in Med., Corr. Member of the RAS, Professor (Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia)

I. Rashal – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the LAS, Professor (Institute of Biology, University of Latvia, Salaspils, Latvia)

R.R. Sadoyan – Dr. Sci. in Biol., Docent (Armenian State Pedagogical University after Kh. Abovyan, Yerevan, Armenia)

A.A. Soloviev – Dr. Sci. in Biol., Professor (All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia)

N.A. Surin – Dr. Sci. in Agricul., Corr. Member of the RAS, Professor (Krasnoyarsk Research Institute of Agriculture – Division of Federal Research Center “Krasnoyarsk Scientific Center, SB RAS”, Krasnoyarsk, Russia)

V.A. Trifonov – Dr. Sci. in Biol., Professor (Institute of Molecular and Cellular Biology of the Siberian Branch of the RAS, Novosibirsk, Russia)

V.S. Fishman – Cand. Sci. in Biol. (Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia)

S.V. Shekhovtsov – Cand. Sci. in Biol. (Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia)

СОДЕРЖАНИЕ • 2021 • 7 • 4

- Генетика растений**
- 163 **Обзор**
Глиадины: структура
и токсичные эпитопы
Н.А. Виниченко, Е.А. Салина
- 172 **Оригинальное исследование**
Анализ экспрессии гена Q,
контролирующего ряд важных
признаков пшениц, включенных в процесс
доместикации и селекции
*К.А. Головина, А.Г. Блинов, В.И. Майоров,
Н. Ватанабе, Н.П. Гончаров*
- Биотехнология**
- 176 **Оригинальное исследование**
Получение трансгенных линий мышей
для изучения возможности конверсии лактозы
в галактоолигосахариды в молочной железе
*А.В. Смирнов, А.Н. Кораблев, А.М. Юнусова,
Т.А. Шнайдер, И.А. Серова*
- 194 **Оригинальное исследование**
Клонирование и экспрессия гена целлюлазы
Penicillium sp. 'occitanis' в *Komagataella phaffii* T07,
выделение и анализ свойств
*А.С. Розанов, М.Е. Воскобоев, Н.В. Богачева, А.В. Коржук, В.Н. Шляхтун,
И.А. Мецерьякова, В.А. Романцев, Д.В. Бочков, А.В. Задорожный, С.Е. Пельтек*
- Письма в редакцию**
- 201 **Обзор**
Научная компонента селекции
(по вопросам, поднятым
в спецвыпуске «Вавиловского журнала
генетики и селекции», 2021, Т. 25, № 4)
В.И. Глазко

CONTENTS • 2021 • 7 • 4

- Plant genetics**
- 163 **Review**
Gliadins: structure
and toxic epitopes
N.A. Vinichenko, E.A. Salina
- 172 **Original article**
Expression analysis of Q gene,
controlling of the important domestication
and breeding wheat traits
*K.A. Golovnina, A.G. Blinov, V.I. Mayorov,
N. Watanabe, N.P. Goncharov*
- Biotechnology**
- 176 **Original article**
Generating transgenic mice
for investigating direct lactose conversion
into galactooligosaccharides in mammary gland
*A.V. Smirnov, A.N. Korablev, A.M. Yunusova,
T.A. Shnaider, I.A. Serova*
- 194 **Original article**
Cloning and expression of a cellulase gene
from *Penicillium* sp. 'occitanis'
in *Komagataella phaffii* T07
*A.S. Rozanov, M.E. Voskoboev, N.V. Bogacheva, A.V. Korzhuk, V.N. Shlyahntun,
I.A. Mescheryakova, V.A. Romancev, D.V. Bochkov, A.V. Zadorozhnyy, S.E. Peltek*
- Letters to the Editor**
- 201 **Review**
The scientific component of breeding:
questions raised in the special issue
of the Vavilov Journal of Genetics
and Breeding, 2021;25(4)
V.I. Glazko

 pismavavilov.ru

DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-21

Обзор

Глиадины: структура и токсичные эпитопы

Н.А. Виниченко^{1,2}, Е.А. Салина^{1,2}

Аннотация: В обзоре показаны особенности структуры глиадинов, а также распределение эпитопов, связанных с целиакией, среди глиадинов разных типов. Рассмотрено несколько приоритетных подходов, позволяющих ускорить создание сортов пшеницы с улучшенным составом глютена (клейковины), безопасного для здоровья.

Ключевые слова: пшеница; глютен (клейковина); структура глиадинов; эпитопы целиакии.

Благодарности: Работа поддержана бюджетным проектом № 0259-2021-0012.

Для цитирования: Виниченко Н.А., Салина Е.А. Глиадины: структура и токсичные эпитопы. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;7(4):163-171. DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-21

Review

Gliadins: structure and toxic epitopes

N.A. Vinichenko^{1,2}, E.A. Salina^{1,2}

Abstract: This review shows features of the gliadins structure and the distribution of epitopes associated with celiac disease, among gliadins of different types. Several priority approaches were considered to accelerate the development of wheat varieties with an improved composition of gluten, safe for health.

Key words: wheat; gluten; gliadins structure; celiac disease epitopes.

For citation: Vinichenko N.A., Salina E.A. Gliadins: structure and toxic epitopes. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;7(4):163-171. DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-21 (in Russian)

Введение

Известно, что свойства пшеничного зерна, которые позволяют использовать его для выпекания хлеба, обеспечиваются двумя разновидностями глютенобразующих запасных белков эндосперма: растворимых в спирте глиадинов и глютеинов, растворимых в разбавленных кислотах и основаниях (Osborne, 1907; Труфанов, 1994; Wieser, 2007; Singh et al., 2011). Считается, что на пластичность и растяжимость глютена (клейковины) влияют глиадины, а глютеины обеспечивают вязкость, эластичность и прочность глютена (Rodrigues et al., 2005). Отношение количества глютеинов к количеству глиадинов регулирует прочность и растяжимость теста (Wrigley et al., 2006).

Глиадины составляют 40–50 % общего запасного белка (Anderson et al., 1997). Они содержат большое количество остатков пролина (P) и глутамина (Q), но отличаются низким содержанием лизина (K). В глютеинах содержание лизина выше, чем в глиадинах. Вместе глиадины и глютеины составляют 80–85 % от общего количества белков пшеничной муки (Veraverbeke, Delcour, 2002). В состав глютеиновых полипептидов входят субъединицы глютеина с высокой молекулярной массой (HMW-GS: 90–140 кДа) и субъединицы с низкой молекулярной массой (LMW-GS: 30–75 кДа). Остатки цистеина субъединиц HMW-GS образуют внутрицепочечные дисульфидные связи, значительно стабилизирующие полимеры глютена (Lefebvre, Mahmoudi, 2007).

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Курчатовский геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия
Kurchatov Genomic Center of ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia

 vinia@bionet.nsc.ru

 Виниченко Н.А., Салина Е.А., 2021

Глиадины – мономерные белки с молекулярным весом 30000–75000 Да, при гидратации ведущие себя как вязкая жидкость (Singh, Khatkar, 2005; Song, Zheng, 2008). Вязкость мономерных глиадинов обеспечивается посредством нековалентных взаимодействий, таких как водородная связь, вандерваальсовы взаимодействия, электростатические и гидрофобные взаимодействия. Кроме того, глиадины могут также взаимодействовать с глютеиновыми полимерами посредством нековалентных гидрофобных взаимодействий и с глутаминовыми остатками – посредством водородных связей (Wellner et al., 2003).

В настоящее время для разделения глиадиновых компонентов и идентификации сортов пшеницы широко используют различные способы электрофореза и хроматографии. Согласно современной классификации выделяют α/β -, γ -, δ -, $\omega 5$ -, $\omega 1$ -, $\omega 2$ - глиадины (Wieser, 2007), ориентируясь на электрофоретическую подвижность. Известно, что α/β -глиадины обладают наибольшей электрофоретической подвижностью, а ω -глиадины – наименьшей. Из-за структурной гомологии, выявленной при аминокислотном секвенировании, α - и β -глиадины часто объединяют в одну группу (Barak et al., 2015). Исследование аминокислотных последовательностей показало родственность α - и γ -глиадинов с LMW-GS (Veraverbeke, Delcour, 2002). Омега-глиадины разделяются на $\omega 1$ -, $\omega 2$ и $\omega 5$ типы. Типы $\omega 1$ и $\omega 2$ имеют сходный аминокислотный состав и N-концевые последовательности, кодируются хромосомами 1A и 1D. Тип $\omega 5$ содержит больше глутамина и имеет другую N-концевую последовательность, кодируется хромосомой 1B (DuPont et al., 2004).

Генотип мягкой пшеницы кодирует более 50 различных полипептидов глиадина. Синтез глиадинов у мягкой пшеницы контролируется шестью основными локусами: *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1*, расположенными в дистальной части коротких плеч хромосом гомеологической группы 1; *Gli-A2*, *Gli-B2*, *Gli-D2*, картированными в дистальной части коротких плеч хромосом гомеологической группы 6 (Metakovsky et al., 2021). Каждый *Gli*-аллель кодирует два или более полипептидов глиадина (блок электрофоретических полос), которые наследуются совместно. Гены, кодирующие γ -, ω - или δ -глиадины, расположены преимущественно в локусах *Gli-1*, тогда как гены всех α/β - и некоторых γ -глиадинов находятся в локусах *Gli-2*. Основные локусы глиадинов являются мультигенными, что осложняет их изучение (Qi, 2006).

Установлено, что глиадины могут вызывать возникновение целиакии (celiac disease – CD) у генетически восприимчивых индивидуумов. Пептиды глиадина, стимулирующие CD, как правило, содержат один или несколько антигенных детерминант (эпитопов), способных связываться с Т-клетками человека. Эпитопы, например 33-мерный токсичный пептид α -глиадина LQLQPFQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF, обычно богаты пролином и глутамином, и высокое содержание пролина делает их устойчивыми к расщеплению протеазами (Sollid, 2000; du Pré, Sollid, 2015; Stammaes, Sollid, 2015). Такие эпитопы также присутствуют в HMW-GSs и LMW-GSs, но в меньшем количестве (Shewry, Tatham, 2016). Эти эпитопы связываются со специфическими гаплотипами белков лейкоцитарного антигена человека (HLA) II класса, то есть HLA-DQ2.2, HLA-DQ2.5, HLA-DQ8 и HLA-DQ8.5, экспрес-

сируемых на поверхности CD4 + Т-клеток (Wang et al., 2017). Это вызывает сложные биохимические и биологические события в клетке, ведущие к разрушению эпителиальных клеток и атрофии ворсинок в тонком кишечнике (Sollid, 2000; du Pré, Sollid, 2015; Stammaes, Sollid, 2015). При целиакии обычно происходит нарушение всасывания дисахаров, жиров, витаминов, железа, кальция; а также нарушаются транспорт цистина и обмен триптофана. У пациентов с целиакией повышается вероятность развития Т-клеточной лимфомы и остеопороза (Tack et al., 2010). В обзоре рассмотрены структура различных типов глиадинов, а также токсичность некоторых из них.

Структура и аминокислотный состав глиадинов

Первичная структура глиадиновых белков имеет большое значение, поскольку они, будучи детерминантами качества муки, влияют на развитие пищевой целиакии (Wang et al., 2017). В типичном глиадиновом протеине после сигнальной последовательности присутствуют пять доменов (Barak et al., 2015) (рис. 1):

- (I) N-концевой домен.
- (II) Домен повторов, он богат глутамином и состоит из умеренно консервативных повторов длиной 5–7 аминокислот (AK). (В α -глиадинах полиглутаминовую последовательность в конце этого домена некоторые исследователи (Noma et al., 2016) выделяют в отдельный полиглутаминовый домен.)
- (III) Уникальный домен.
- (IV) Полиглутаминовый домен размером 7–28 аминокислот. (В сорте пшеницы Cheyenne идентифицирован необычный α -глиадиновый ген, содержащий полиглутаминовый домен длиной 107 аминокислот (Noma et al., 2016).)
- (V) Уникальный домен.

Вторичная структура молекул разных типов глиадинов отличается. По последним данным, α/β -глиадины имеют компактные глобулярные структуры, а γ - и ω -глиадины – удлиненные и стержнеобразные структуры (Paananen et al., 2006; Ang et al., 2010).

Альфа- и бета-глиадины

Эти два типа белков глиадинов имеют сходные первичные структуры, состоящие приблизительно из 250 и 300 остатков аминокислот. Первичная структура α/β -глиадинов (см. рис. 1) содержит сигнальный пептид (20 аминокислот); короткий N-терминальный домен (5 аминокислотных остатков); домен с повторами, содержащий богатые пролином и глутамином повторяющиеся последовательности: гептапептид P-Q-P-Q-P-F-P и пентапептид P-Q-Q-P-Y (Ferranti et al., 2007). Некоторые авторы выделяют из состава этого домена отдельный полиглутаминовый домен, уникальный домен, полиглутаминовый домен и уникальный C-терминальный домен. Альфа-глиадины в своих уникальных доменах (III, V) содержат шесть остатков цистеина, которые образуют три внутривещечные перекрестные связи (Altenbach et al., 2010). Также сообщалось об α -глиадинах с нечетным числом остатков цистеина (Anderson et al., 1997). Такие глиадины могут образовывать одну межмолекулярную S-S связь и

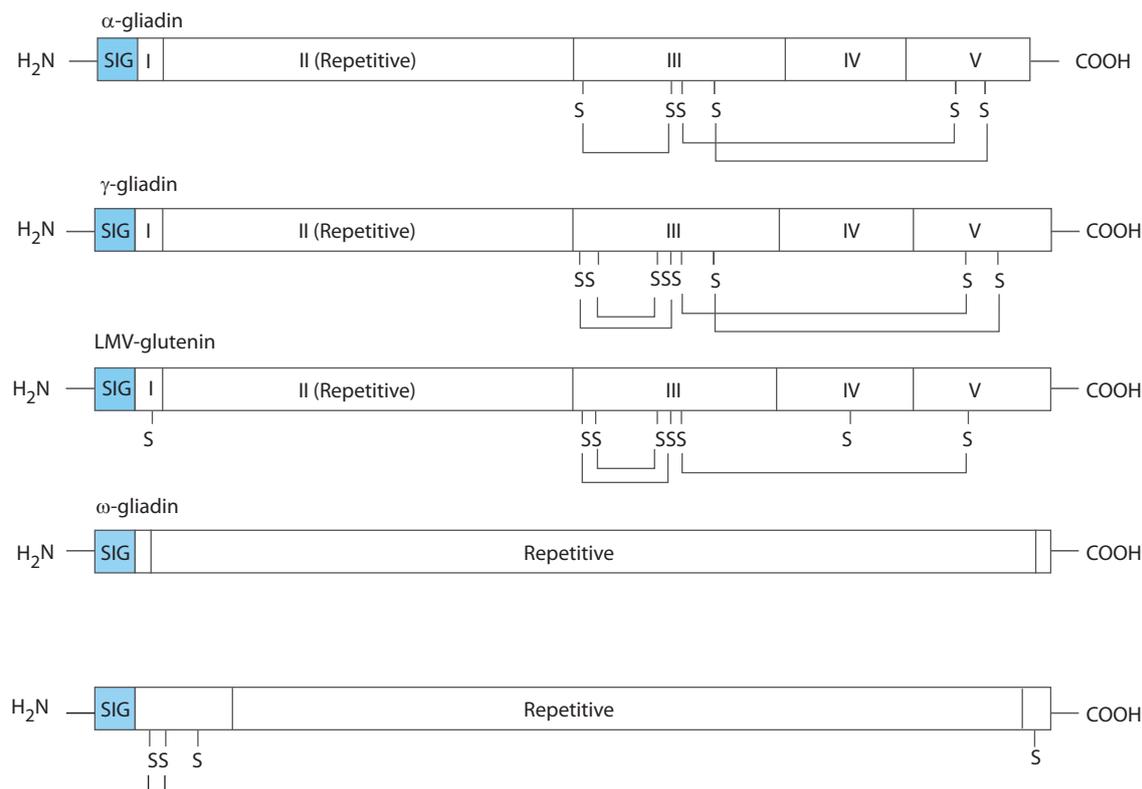


Рис. 1. Общая структура глиадинов и глютеинов пшеницы. Схематично показаны домены основной последовательности, консервативные цистеиновые остатки (S) и внутримолекулярные дисульфидные связи (линии, соединяющие Ss). Сигнальные пептиды (SIG) отмечены синим цветом. Схематически полипептидная цепь β -глиадина соответствует α -глиадину, а δ -глиадину – γ -глиадину. Зрелая полипептидная последовательность α/β - и γ -глиадинов, а также LMW-глютеинов состоит из пяти секций: I – короткий неповторяющийся пептид (N-концевой домен), II – повторяющийся домен, состоящий из вариаций коротких мотивов, III – неповторяющаяся область, содержащая большинство остатков цистеина, IV – богатый глутамином домен и V – неповторяющийся C-концевой домен. Омега-глиадины обычно не имеют цистеинов и, следовательно, дисульфидных связей (по: Anderson et al., 2012)

действовать как терминаторы синтеза глютеина и, вероятно, уменьшать молекулярный вес полимерной цепи глютеина (Kajendran et al., 2019; Noma et al., 2016).

Гамма-глиадины

Полипептид γ -глиадина состоит из ряда доменов (см. рис. 1): сигнальной последовательности (20 остатков); далее N-концевой пептид (12 аминокислот), за ним следует домен повторов (домен II), состоящий главным образом из пролина и глутамина, заявленной типичной единицей γ -глиадинов является PFPQ₁₋₂ (PQQ)₁₋₂, повторов может быть 7–22. Далее располагаются уникальные последовательности (домены III и V) с включениями нерегулярных повторов и отделенные друг от друга полиглутаминовым доменом, состоящим из 6–16 аминокислот (домен IV) (Qi et al., 2009). Большая часть цистеиновых остатков (6 из 8), образующих дисульфидные связи, находится в III домене. В настоящее время клонировано и изучено более 340 генов, кодирующих γ -глиадины (Metakovsky et al., 2019). Известно, что эти гены различаются по количеству повторений в домене II, нуклеотидным замещениям и малым делециям и инсерциям, а также по длине домена IV (Metakovsky et al., 2019). Таким образом, α -, β - и γ -глиадины имеют возможность большего взаимодействия

с глютеином из-за большего количества остатков цистеина по сравнению с ω -глиадинами.

Омега-глиадины

Омега-глиадины имеют больший молекулярный вес, чем другие глиадины, – от 41.0 до 51.5 кДа. Большинство из них также более кислые, чем другие глиадины, с pI от 4.68 до 6.16. Общая структура белка ω -глиадина включает: сигнальный пептид (19 аминокислотных остатков), далее N-концевой домен (10–11 остатков), домен повторов, охватывающий 90–96 % белка, и C-концевой домен (10–11 остатков) (см. рис. 1).

Остатки пролина (P), глутамина (Q) и фенилаланина (F) составляют 80 % от общего количества аминокислот в ω -глиадинах по сравнению с 50–60 % для других глиадинов (Hisa, Anderson, 2001). Они также могут содержать незначительное количество метионина (M) и цистеина (C) (серосодержащих АК) или не содержать их. По этой причине ω -глиадины не способны создавать внутрицепочечные дисульфидные связи и формировать компактную структуру. Эти глиадины имеют мало заряженных АК, таких как лизин (K), гидрофобность их поверхности ниже, чем у α - и γ -глиадинов. Были обнаружены ω -глиадины, имеющие один

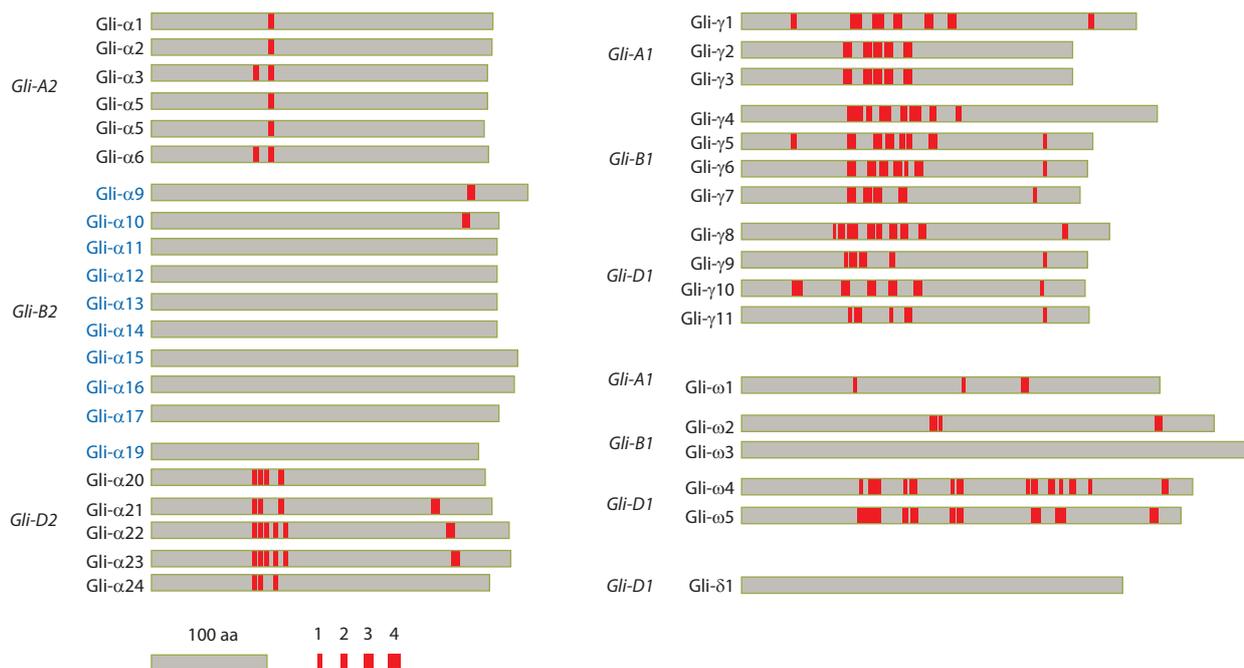


Рис. 2. Представлены шесть локусов *Gli* (*Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1*, *Gli-A2*, *Gli-B2* и *Gli-D2*), кодирующих различные глиадины. Четыре закрашенных красных прямоугольника различной ширины указывают от одной до четырех копий эпитопов CD соответственно. CSSTT α-глиадины (от *Gli-α9* до *Gli-α17* и *Gli-α19*) отмечены синим цветом (по: Wang et al., 2017)

остаток цистеина (C) и способные действовать в качестве терминаторов полипептидной цепи глютеина (Gianibelli et al., 2002).

D.D. Kasarda с сотрудниками (1983) использовали N-концевые белковые последовательности для классификации ω-глиадинов на основе первых трех аминокислот зрелого белка. Эти последовательности получили названия ARQ-/ARE, KEL- и SRL-типов в зависимости от первых трех АК их N-концевых последовательностей (Tatham, Shewry, 1995). Тип ARQ-/ARE кодируется генами, локализованными на хромосомах 1A и 1D. SRL-тип характерен для ω-глиадинов, кодируемых генами на хромосоме 1B (Tatham, Shewry, 1995; DuPont et al., 2000). KEL-тип отличается от ARQ-типа отсутствием первых восьми аминокислотных остатков в его структуре (Hisa, Anderson, 2001).

Дельта-глиадины

Общая структура δ-глиадинов пшеницы аналогична структуре, показанной на рис. 1 для γ-глиадинов. Домен SIG представляет собой сигнальный пептид, отщепляемый во время процессинга белка. Домены II и IV богаты глутамином, домен II состоит из вариаций повторяющегося мотива, а домен IV богат глутамином без четкой структуры повторения. Домены I, III и V являются неповторяемыми, причем домены III и V содержат консервативные положения цистеина, которые могут образовывать четыре внутримолекулярные дисульфидные связи, предполагающие схемы связей, аналогичные другим классам глиадинов (Anderson et al., 2012).

Эпитопы глиадинов, вызывающие целиакию и пищевую анафилаксию, индуцированную физическими нагрузками

Пептиды глиадинов, которые способствуют целиакии, обычно содержат один или несколько эпитопов, способных связываться с T-клетками человека (Sollid, 2000; du Pré, Sollid, 2015; Stamnaes, Sollid, 2015). К настоящему времени выявлено более 30 эпитопов, вовлеченных в целиакию (Scherf et al., 2016; Shewry, Tatham, 2016). Разные типы глиадинов существенно различаются по содержанию эпитопов, вызывающих целиакию (Wang et al., 2017).

Пищевая анафилаксия, ассоциированная с глютенем пшеницы, индуцированная физическими нагрузками (wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis – WDEIA), и астма пекаря – две часто встречающиеся IgE-опосредованные аллергии на пшеницу с оценкой заболеваемости от 0.33 до 1.17 % (Cabanillas, 2020). HMW-GSs и полипептиды группы ω-5 глиадинов являются основными аллергенами, связанными с WDEIA (Matsuo et al., 2004, 2005; Altenbach et al., 2018). Однако многие другие белки зерна пшеницы, например ингибиторы α-амилазы/трипсина (ATI) и белки неспецифического переноса липидов (nsLTP), также могут быть вовлечены в IgE-опосредованную аллергию на пшеницу (Juhász et al., 2018; Cabanillas, 2020).

Каждую из белковых последовательностей 38 глиадинов, накопленных в зрелых зернах сорта пшеницы Xiaoyan 81, D.W. Wang с сотрудниками (2017) исследовали на предмет наличия 24 эпитопов CD, ранее обнаруженных в различных

Таблица 1. Содержание CD эпитопов в α -глиадинах сорта Чайниз Спринг (по: Altenbach et al., 2020)

Ген	Прогнозируемый молекулярный вес кодируемого белка, Да	Количество CD эпитопов ^a
α -A1	31 440	1
α -A2	34 471	1
α -A4	30 506	2
α -A5	33 479	2
α -A6	30 621	2
α -A8	31 050	2
α -A9	32 181	1
α -A10	29 996	2
α -B3	36 206	1
α -B7	33 968	0
α -B8	34 781	0
α -B9	33 977	0
α -B11	31 535	0
α -B14	31 413	0
α -B15	31 284	0
α -B16	32 054	0
α -B17	32 039	0
α -B18	31 829	0
α -B25	33 818	1
α -D1	30 699	1
α -D4	31 542	3
α -D5	33 412	8 ^b
α -D6	31 706	5
α -D8	31 435	6
α -D9	30 810	6
α -D12	30 175	0

^a CD-релевантные эпитопы включают DQ2.5-glia- α 1a (PFPQPQLPY), DQ2.5-glia- α 1b (PYPQPQLPY), DQ2.5-glia- α 2 (PQPQLPYPQ), DQ2.5-glia- α 3 (FRPQQPYPQ), DQ8-glia- α 1/ DQ8.5-glia- α 1 (QGSFQPSQQ).

^b Также содержит 33-мерный токсичный пептид (LQLQPFQQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF).

глиадинах (рис. 2). У 11 γ -глиадинов имеются наиболее разнообразные и многочисленные эпитопы CD, за ними следуют пять α -глиадинов (от *Gli-a20* до *Gli-a24*), кодируемые локусом *Gli-D2*, и четыре ω -глиадина, кодируемые локусом *Gli-A1* (*Gli- ω 1*), *Gli-B1* (*Gli- ω 2*) или *Gli-D1* (*Gli- ω 4* и *Gli- ω 5*); число CD эпитопов в этих 20 глиадинах варьирует от 3 до 23. Токсичный пептид α -глиадина, состоящий из 33 аминокислотных остатков и несущий три эпитопа: DQ2.5-glia- α 1a, DQ2.5-glia- α 1b и DQ2.5-glia- α 2, – также был обнаружен в последовательностях глиадинов. Расположенные на локусе *Gli-D2* α -глиадины *Gli-a20*, *Gli-a22* и *Gli-a23* несут все три эпитопа, а *Gli-a21* и *Gli-a24* – два из трех эпитопов (см. рис. 2). Остальные 18 глиадинов содержали меньше эпитопов CD или не содержали их. В частности, два эпитопа обнаружены в каждом из восьми α -глиадинов с локуса *Gli-A2* (от *Gli-a1* до *Gli-a6*) и *Gli-B2* (*Gli-a9* и *Gli-a10*); эпитоп не присутствовал в семи α -глиадинах (*Gli-a11* и *Gli-a17*) локуса *Gli-B2*, *Gli-a19* локуса *Gli-D2*, *Gli- δ 1* локуса *Gli-D1* и *Gli- ω 3* локуса *Gli-B1* (см. рис. 2).

S.B. Altenbach с коллегами (2020) изучили содержание эпитопов целиакии и WDEIA в различных типах глиа-

динов сорта пшеницы Чайниз Спринг (табл. 1 и 2). Как и в сорте Хяоуан 81, наиболее богаты эпитопами целиакии γ -глиадины. Значительное количество токсичных эпитопов содержат α -глиадины D-генома – α -D4, α -D5, α -D6, α -D8, α -D9. Кодируемые B-геномом ω -глиадины (ω -B3 и ω -B6) не содержат эпитопы целиакии, зато обогащены WDEIA эпитопами. D-геном кодирует ω -глиадины (ω -D1, ω -D2, ω -D3), несущие по 12 или 18 CD эпитопов, а также глиадин ω -D4, содержащий 33 WDEIA эпитопов.

Стратегии улучшения состава глютенных белков

Очень важная задача на данный момент – улучшение качества муки с одновременным снижением токсичности глютенных белков для чувствительных к этой фракции белков людей. Однако решение этой задачи не может быть простым, поскольку многие белки глютена, несущие токсичные эпитопы, важны для качества муки. Недавние исследования показали, что уменьшение накопления глиадина может снизить количество эпитопов, не влияя на качество муки, а многие белки глютена не содержат такие эпитопы. Разработано несколько стратегий для получения генотипов пшеницы,

Таблица 2. Содержание CD и WDEIA эпитопов в δ -, γ -, ω -глиадинах сорта Чайниз Спринг (по: Altenbach et al., 2020)

Ген	N-концевая последовательность кодируемого белка	Количество эпитопов	
		CD ^a	WDEIA ^b
δ -B1	IVQL	0	0
δ -D1	QLDP	0	0
γ -A1	NIQ	10	0
γ -A3 ^c	NMQ	5	0
γ -A4 ^c	NMQ	5	0
γ -B1	NMQ	8	0
γ -B2	NMQ	6	0
γ -B4	NMQ	10	0
γ -B6	NMQ	5	0
γ -D1	NMQ	7	0
γ -D2	NIQ	10	0
γ -D3	NMQ	6	0
γ -D4	NMQ	6	0
ω -A4 ^d	ARQ	3	0
ω -B3	SRL	0	26
ω -B6	SRL	0	29
ω -D1	ARQ	12	0
	KELQj	12	0
ω -D2 ^{c, e}	ARE	18	0
	KELQj	18	0
ω -D3 ^{c, e}	ARE	18	0
	KELQj	18	0
ω -D4 ^d	TRQ	0	33

^a CD-релевантные эпитопы включают DQ2.5-glia- γ 1/DQ8-glia- γ 1 (PQSFPPQQ), DQ2.5-glia- γ 2 (IQPQQPAQL), DQ2.5-glia- γ 3/DQ8-glia- γ 1b (QQPQQPYPQ), DQ2.5-glia- γ 4a (SQPQQQFPQ), DQ2.5-glia- γ 4b (PQPQQQFPQ), DQ2.5-glia- γ 4c/DQ8-glia- γ 1a (QQPQQPFPQ), DQ2.5-glia- γ 4d (PQPQQPFCQ), DQ2.5-glia- γ 5 (QQPFPQQPQ), DQ2.5-glia- ω 1 (PFPQQQPF), DQ2.5-glia- ω 2 (PQPQQPFPW), DQ2.5-gliut-L1 (PFSQQQQPV) и DQ2.5-gliut-L2 (FSQQQQSPF). Остатки глутамина, дезамидированные трансклутаминой 2, могут различаться в эпитопах DQ2.5 и DQ8.

^b Доминантные эпитопы, участвующие в WDEIA, серьезной пищевой аллергии, индуцированной физическими нагрузками анафилаксии, включают QQIFPQQ, QQFPQQ, QQSPEQQ и QQSPQQ.

^c Гены кодируют идентичные белки.

^d Стоп-кодон около 3'-конца гена приводит к усеченному белку. Считается псевдогеном.

^e Вторая N-концевая последовательность, наблюдаемая в результате процессинга аспарингилпротеазой.

безопасных для здоровья. Ниже приведено краткое изложение пяти многообещающих подходов для улучшения связанных со здоровьем характеристик путем удаления (или модификации) токсичных белков глютена с одновременным усилением функций глютенных белков без патологических эпитопов (Wang et al., 2020).

Первый подход заключается в использовании РНК-интерференции (RNAi) для подавления синтеза всех или определенных типов глиадинов в трансгенных растениях пшеницы. В целом, линии с подавлением синтеза определенных типов глиадинов показали пониженное содержание глиадина и снижение иммуногенного потенциала глютена (Barro et al., 2016; Blechl et al., 2016; Altenbach et al., 2019). Например, F. Barro с коллегами (2016) подавляли экспрессию генов, кодирующих α -, γ - и ω -глиадины, используя комбинацию конструкций RNAi, которые устраняли эпитопы CD из высокоиммуногенных α - и ω -глиадинов, но не влияли на содержание общего белка и крахмала в зернах. RNAi также

успешно использовали для подавления синтеза ω -5 глиадинов; полученные линии показали снижение иммуногенного потенциала глютена и были рекомендованы для больных с WDEIA (Altenbach, Allen, 2011; Altenbach et al., 2015). Недавно S.B. Altenbach с сотрудниками (2019) снизили экспрессию ω -1,2-глиадинов с помощью RNAi, что также привело к снижению иммуногенного потенциала глютена.

Второй подход подразумевает создание делеционных линий пшеницы, в которых отсутствует один или несколько локусов глиадина (Waga et al., 2013; Camerlengo et al., 2017). J. Waga с коллегами (2013) разработали три делеционные линии по глиадину с нулевым аллелем соответственно в *Gli-D1*, *Gli-B1* или *Gli-B2*. Обнаружено снижение иммунореактивности белков глютена в делеционных линиях на 6–18 % в сравнении с контролем дикого типа. Позже были разработаны генотипы пшеницы, лишённые как ω -1,2, так и ω -5 глиадинов. Полученные линии демонстрировали 30 % снижение иммунореактивности глиадина, при этом улучшая

содержание и прочность глютена (Waga, Skoczowski, 2014). F. Camerlengo с сотрудниками (2017) описали три делеционные линии пшеницы, лишённые локусов *Gli-A2*, *Gli-D2* и *Gli-A2/Gli-D2* соответственно. В этих линиях экспрессия α -глиадина была сильно снижена, а 33-мерный токсичный пептид глиадинов отсутствовал в линиях, лишённых *Gli-D2* или *Gli-A2/Gli-D2*. Создано шесть делеционных линий пшеницы, в каждой из которых отсутствует один из шести глиадиновых локусов (Wang et al., 2017). Линия DL*GliD2* без локуса *Gli-D2* показала улучшенную функциональность теста, при этом уровень эпитопов CD значительно снизился (Wang et al., 2017).

Третий подход состоит в разработке трансгенных линий пшеницы, экспрессирующих сконструированные «глутеназы» для направленной деградации индуцирующих целиакию эпитопов в кишечнике (Osorio et al., 2019). С.Е. Osorio с коллегами (2019) создали трансгенные линии пшеницы с эндосперм-специфической экспрессией эндопротеазы B2 (EP-HvB2) ячменя, пролилэндопептидазы (PE-FmPep) *Flavobacterium meningosepticum* и пролилэндопептидазы (PE-PfuPep) *Pyrococcus furiosus*. Эти предварительно подготовленные детоксификаторы глютена (EP-HvB2 + PE-FmPep или EP-HvB2 + PE-PfuPep) не влияли на качество глютена, но могли разрушать эпитопы CD, содержащиеся в 33-мерном пептиде глиадина, в моделируемых желудочно-кишечных условиях (Osorio et al., 2019).

Четвёртый подход заключается в снижении синтеза белков глютена путем манипулирования регуляторами, контролирующими экспрессию гена проламина (Moehs et al., 2019). S. Wen с сотрудниками (2012) продемонстрировали, что функциональное подавление пшеничного гена DME, который кодирует 5-метилцитозин ДНК-гликозилазу, приводит к снижению накопления LMW-GS и глиадинов. Недавно было показано, что устранение гомеологических генов, кодирующих WPBF (wheat prolamins-box binding factor), привело к снижению накопления LMW-GS и глиадинов, которые вместе составляли 50–60 % белков глютена пшеницы (Moehs et al., 2019). Эти регуляторные гены служат потенциально полезными мишенями для создания линий пшеницы с низким содержанием глютена, но необходимо смягчить влияние мутаций этих генов на уменьшение размеров зерна, снижение уровня общего белка и крахмала (Moehs et al., 2019).

Пятый подход – модифицировать экспрессию генов глютена с помощью методов геномного редактирования. Геномное редактирование – быстро развивающаяся технология для внесения сайт-нацеленных мутаций в генные и регуляторные области (Yin et al., 2017; Knott, Doudna, 2018; Chen et al., 2019). В систему геномного редактирования входит нуклеаза, например Cas9 или Cpf1, и направляющая РНК (single guide RNA, sgRNA); sgRNA комплементарна целевому сайту и направляет рибонуклеарный белковый комплекс к этому конкретному сайту. В зависимости от используемых методов геномного редактирования можно получить делеции различной протяженности либо точечные замены нуклеотидов в целевом сайте (Chen et al., 2019). Редактирование генома может выполняться для одного или нескольких генов с одной или несколькими sgRNA. Используя систему CRISPR/Cas9-, удалось изменить большое количество генов

α -глиадина в пшенице (до 35), при этом иммунореактивность белков глютена снизилась на 85 % (Sánchez-León et al., 2018). A. Jouanin с коллегами (2019) подтвердили, что CRISPR/Cas9 эффективен при мутации генов α -глиадина, а также показали, что этот метод можно использовать для мутации пшеничных генов γ -глиадина.

Из различных подходов, описанных выше, редактирование генома является относительно новым, и его возможности для изменения экспрессии белка глютена еще предстоит полностью использовать. В последние годы в связи с широким развитием методов геномного редактирования появилась возможность создавать до 12 базовых замен, вставок (от 1 до ≥ 44 п.н.), делеций (от 1 до ≥ 80 п.н.) и их комбинаций в заранее определенном целевом сайте, контролирующем белки, входящих в состав глютена (Anzalone et al., 2019). Возможность проводить мультиплексное геномное редактирование позволяет изменять различные семейства генов, что, безусловно, будет иметь высокий потенциал в улучшении состава глютеиновых белков.

Заключение

Исследования последних лет существенно улучшили понимание состава и структуры глиадинов. Были получены полногеномные сведения о типах и структурах иммуногенных глиадиновых белков, а также протестированы ценные подходы для улучшения состава глютена пшеницы. Тем не менее все еще существуют серьезные пробелы в знаниях о контроле экспрессии глиадиновых генов, а также о биохимических и биофизических механизмах, лежащих в основе взаимодействий белков глютена. В будущем сочетание геномных исследований, функциональной геномики и методов геномного редактирования ускорит фундаментальные и прикладные исследования белков глютена, что позволит эффективно разрабатывать элитные сорта пшеницы, безопасные для здоровья и обладающие глютеином высокого качества.

Список литературы / References

- Труфанов В.А. Клейковина пшеницы: проблемы качества. Новосибирск: Наука, 1994.
[Trufanov V.A. Wheat gluten: quality problems. Novosibirsk: Nauka Publisher, 1994. (in Russian)]
- Altenbach S.B., Allen P.V. Transformation of the US bread wheat 'Butte 86' and silencing of omega-5 gliadin genes. *GM Crops*. 2011;2(1):67-74. DOI 10.4161/gmcr.2.1.15884.
- Altenbach S.B., Vensel W.H., DuPont F.M. Analysis of expressed sequence tags from a single wheat cultivar facilitates interpretation of tandem mass spectrometry data and discrimination of gamma gliadin proteins that may play different functional roles in flour. *BMC Plant Biol*. 2010;10:7. DOI 10.1186/1471-2229-10-7.
- Altenbach S.B., Tanaka C.K., Pineau F., Lupi R., Drouet M., Beaudouin E., Morisset M., Denery-Papini S. Assessment of the allergenic potential of transgenic wheat (*Triticum aestivum*) with reduced levels of omega-5 gliadins, the major sensitizing allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J. Agric. Food Chem*. 2015;63(42):9323-9332. DOI 10.1021/acs.jafc.5b03557.
- Altenbach S.B., Chang H.C., Simon-Buss A. Jang Y.R., Denery-Papini S., Pineau F., Gu Y. Q., Huo N., Lim S.H., Kang C.S., Lee J.Y. Towards reducing the immunogenic potential of wheat flour: omega gliadins encoded by the D genome of hexaploid wheat may also harbor epitopes for the serious food allergy WDEIA. *BMC Plant Biol*. 2018;18:291. DOI 10.1186/s12870-018-1506-z.

- Altenbach S.B., Chang H.C., Yu X.B., Seabourn B.W., Green P.H., Alaedini A. Elimination of omega-1,2 gliadins from bread wheat (*Triticum aestivum*) flour: effects on immunogenic potential and end-use quality. *Front. Plant Sci.* 2019;10:580. DOI 10.3389/fpls.2019.00580.
- Altenbach S.B., Chang H.C., Simon-Buss A., Mohr T., Huo N., Gu Y.Q. Exploiting the reference genome sequence of hexaploid wheat: a proteomic study of flour proteins from the cultivar Chinese Spring. *Funct. Integr. Genomics.* 2020;20(1):1-16. DOI 10.1007/s10142-019-00694-z.
- Anderson O.D., Litts J.C., Greene F.C. The α -gliadin gene family: 1. Characterization of ten new wheat α -gliadin genomic clones, evidence for limited sequence conservation of flanking DNA, and southern analysis of the gene family. *Theor. Appl. Genet.* 1997;95(1-2):50-58.
- Anderson O.D., Dong L., Huo N., Gu Y. Q. A New Class of Wheat Gliadin Genes and Proteins. *PLOS PLoS One.* 2012;7(12):e52139. DOI 10.1371/journal.pone.0052139.
- Anzalone A.V., Randolph P.B., Davis J.R., Sousa A.A., Koblan L.W., Levy J.M., Chen P.J., Wilson C., Newby G.A., Raguram A., Liu D.R. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature.* 2019;576(7785):149-157. DOI 10.1038/s41586-019-1711-4.
- Ang S., Kogulanathan J., Morris G.A., Kok M.S., Shewry P.R., Tatham A.S., Adams G.G., Rowe A.J., Harding S.E. Structure and heterogeneity of gliadin: a hydrodynamic evaluation. *Eur. Biophys. J. Biophys.* 2010;39:255-261. DOI 10.1007/s00249-009-0529-7.
- Barak S., Mudgil D., Khatkar B.S. Biochemical and Functional Properties of Wheat Gliadins: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2015;55(3):357-368. DOI 10.1080/10408398.2012.654863.
- Barro F., lehis J.C., Giménez M.J., García-Molina M.D., Ozuna C.V., Comino I., Sousa C., Gil-Humanes J. Targeting of prolamins by RNAi in bread wheat: effectiveness of seven silencing-fragment combinations for obtaining lines devoid of coeliac disease epitopes from highly immunogenic gliadins. *Plant Biotechnol. J.* 2016;14(3):986-996. DOI 10.1111/pbi.12455.
- Blechl A., Beecher B., Vensel W., Tanaka C., Altenbach S. RNA interference targeting rye secalins alters flour protein composition in a wheat variety carrying 1BL.1RS translocation. *J. Cereal Sci.* 2016;68:172-180. DOI 10.1016/j.jcs.2016.01.009.
- Cabanillas B. Review gluten-related disorders: Celiac disease, wheat allergy, and nonceliac gluten sensitivity. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2020;60(15):2606-2621. DOI 10.1080/10408398.2019.1651689.
- Camerlengo F., Sestili F., Silvestri M., Colaprico G., Margiotta B., Ruggeri R., Lupi R., Masci S., Lafiandra D. Production and molecular characterization of bread wheat lines with reduced amount of α -type gliadins. *BMC Plant Biol.* 2017;17(1):248. DOI 10.1186/s12870-017-1211-3.
- Chen K., Wang Y., Zhang R., Zhang H., Gao C. CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2019;70:667-697. DOI 10.1146/annurev-arplant-050718-100049.
- DuPont F., Vensel W.H., Chan R., Kasarda D.D. Characterization of the 1B-type omega gliadins from *Triticum aestivum* cultivar Butte. *Cereal Chem.* 2000;77(5):607-614. DOI 10.1094/CCHEM.2000.77.5.607.
- DuPont F.M., Vensel W., Encarnacao T., Chan R., Kasarda D.D. Similarities of omega gliadins from *Triticum urartu* to those encoded on chromosome 1A of hexaploid wheat and evidence for their post-translational processing. *Theor. Appl. Genet.* 2004;108(7):1299-1308. DOI 10.1007/s00122-003-1565-9.
- du Pré M.F., Sollid L.M. T-cell and B-cell immunity in celiac disease. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 2015;29(3):413-423. DOI 10.1016/j.bpg.2015.04.001.
- Ferranti P., Mamone G., Picariello G., Addeo F. Mass spectrometry analysis of gliadins in celiac disease. *J. Mass Spectrom.* 2007;42(12):1531-1548. DOI 10.1002/jms.1361.
- Gianibelli M.C., Masci S., Larroque O.R., Lafiandra D., MacRitchie F. Biochemical characterisation of a novel polymeric protein subunit from bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Cereal Sci.* 2002;35(3):265-276. DOI 10.1006/jcs.2001.0401.
- Hisa C.C., Anderson O.D. Isolation and characterization of wheat ω -gliadin genes. *Theor. Appl. Genet.* 2001;103:37-44. DOI 10.1007/s00122-001-0552-2.
- Jouanin A., Schaart J.G., Boyd L.A., Cockram J., Leigh F.J., Bates R., Wallington E. J., Visser R.G.F., Smulders M.J.M. Outlook for coeliac disease patients: towards bread wheat with hypoimmunogenic gluten by gene editing of α - and γ -gliadin gene families. *BMC Plant Biol.* 2019;19:333. DOI 10.1186/s12870-019-1889-5.
- Juhász A., Belova T., Florides C.G., Maulis C., Fischer I., Gell G., Birinyi Z., Ong J., Keeble-Gagnère G., Maharajan A., Ma W., Gibson P., Jia J., Lang D., Mayer K.F.X., Spannagl M. International Wheat Genome Sequencing Consortium, Tye-Din J.A., Appels R., Olsen O.A. Genome mapping of seed-borne allergens and immunoresponsive proteins in wheat. *Sci. Adv.* 2018;4(8):ear8602. DOI 10.1126/sciadv.aar8602.
- Kajendran K., Chandrasekharan N.V., Hettiarachchi C.M., Wijesundera W.S.S. Molecular characterization and expression of α -gliadin genes from wheat cultivar Dacke in Bg 250 rice variety. *GM Crops Food.* 2019;10(2):102-114. DOI 10.1080/21645698.2019.1622990.
- Kasarda D.D., Autran J.C., Lew E.J.L., Nimmo C.C., Shewry P.R. N-terminal amino acid sequences of ω -gliadins and ω -secalins: Implications for the evolution of prolamins genes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1983;747(1-2):138-150. DOI 10.1016/0167-4838(83)90132-2.
- Knott G.J., Doudna J.A. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. *Science.* 2018;361(6405):866-869. DOI 10.1126/science.aat5011.
- Lefebvre J., Mahmoudi N. The pattern of the linear viscoelastic behaviour of wheat flour dough as delineated from the effects of water content and high molecular weight glutenin subunits composition. *J. Cereal Sci.* 2007;45(1):49-58. DOI 10.1016/j.jcs.2006.06.005.
- Matsuo H., Morita E., Tatham A.S., Morimoto K., Horikawa T., Osuna H., Ikezawa Z., Kaneko S., Kohno K., Dekio S. Identification of the IgE-binding epitope in omega-5 gliadin, a major allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J. Biol. Chem.* 2004;279(13):12135-12140. DOI 10.1074/jbc.M311340200.
- Matsuo H., Kohno K., Morita E. Molecular cloning, recombinant expression and IgE-binding epitope of omega-5 gliadin, a major allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *FEBS J.* 2005;272(17):4431-4438. DOI 10.1111/j.1742-4658.2005.04858.x.
- Metakovsky E., Melnik V.A., Pascual L., Wrigley C.W. Gliadin genotypes worldwide for spring wheats (*Triticum aestivum* L.). 2. Strong differentiation of polymorphism between countries and regions of origin. *J. Cereal Sci.* 2019;87(6):311-317. DOI 10.1016/j.jcs.2019.04.015.
- Metakovsky E., Pascual L., Vaccino P., Melnik V., Rodriguez-Quijano M., Popovych Y., Chebotar S., Rogers W.J. Heteroalleles in Common Wheat: Multiple Differences between Allelic Variants of the *Gli-B1* Locus. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(4):1832. DOI 10.3390/ijms22041832.
- Moehs C.P., Austill W.J., Holm A., Large T.A.G., Loeffler D., Mullenberg J., Schnable P.S., Skinner W., van Boxtel J., Wu L., McGuire C. Development of decreased-gluten wheat enabled by determination of the genetic basis of *lys3a* barley. *Plant Physiol.* 2019;179(4):1692-1703. DOI 10.1104/pp.18.00771.
- Noma S., Kawaura K., Hayakawa K., Abe C., Tsuge N., Ojihara Y. Comprehensive molecular characterization of the α/β -gliadin multigene family in hexaploid wheat. *Mol. Genet. Genomics.* 2016;291(1):65-77. DOI 10.1007/s00438-015-1086-7.
- Osborne T.B. The protein of the wheat kernel. Publication No. 84. Washington, DC: Carnegie Institute, 1907.
- Osorio C.E., Wen N., Mejias J.H., Liu B., Reinbothe S., von Wettstein D., Rustgi S. Development of wheat genotypes expressing a glutamine-specific endoprotease from barley and a prolyl endopeptidase from *Flavobacterium meningosepticum* or *Pyrococcus furiosus* as a potential remedy to celiac disease. *Funct. Integr. Genomics.* 2019;19(1):123-136. DOI 10.1007/s10142-018-0632-x.
- Paananen A., Tappura K., Tatham A.S., Fido R., Shewry P.R., Miles M., McMaster T.J. Nanomechanical force measurements of gliadin protein interactions. *Biopolymers.* 2006;63(6):658-667. DOI 10.1002/bip.20603.
- Qi P. F., Wei Y.M., Yue Y.W., Yan Z.H., Zheng Y.L. Biochemical and molecular characterization of gliadins. *Mol. Biol. (Mosk.).* 2006;40(5):796-807.
- Qi P.F., Wei Y.M., Ouellet T., Chen Q., Tan X., Zheng Y.L. The gamma-gliadin multigene family in common wheat (*Triticum aestivum*) and its closely related species. *BMC Genomics.* 2009;10:168. DOI 10.1186/1471-2164-10-168.
- Rodrigues M.M.F., Martins M.M., Costa M.L. Thermal properties of gluten proteins of two soft wheat varieties. *Food Chem.* 2005;93(3):459-465. DOI 10.1016/j.foodchem.2004.10.023.
- Sánchez-León S., Gil-Humanes J., Ozuna C.V., Giménez M.J., Sousa C., Voytas D.F., Barro F. Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol. J.* 2018;16(4):902-910. DOI 10.1111/pbi.12837/

- Scherf K.A., Koehler P., Wieser H. Gluten and wheat sensitivities – an overview. *J. Cereal Sci.* 2016;67:2-11. DOI 10.1016/j.jcs.2015.07.008.
- Shewry P.R., Tatham A.S. Improving wheat to remove celiac epitopes but retain functionality. *J. Cereal Sci.* 2016;67:12-21. DOI 10.1016/j.jcs.2015.06.005.
- Singh M., Khatkar B.S. Structural and functional properties of wheat storage proteins: A review. *J. Food Sci. Technol.* 2005;42(6):455-471.
- Singh S., Singh N., MacRitchie F. Relationship of polymeric proteins with pasting, gel dynamic and dough empirical-rheology in different Indian wheat varieties. *Food Hydrocoll.* 2011;25(1):19-24. DOI 10.1016/j.foodhyd.2010.05.001.
- Sollid L.M. Molecular basis of celiac disease. *Annu. Rev. Immunol.* 2000;18:53-81. DOI 10.1146/annurev.immunol.18.1.53.
- Song Y., Zheng Q. Influence of gliadin removal on strain hardening of hydrated wheat gluten during equibiaxial extensional deformation. *J. Cereal Sci.* 2008;48(1):58-67.
- Stamnaes J., Sollid L.M. Celiac disease: Autoimmunity in response to food antigen. *Semin. Immunol.* 2015;27(5):343-352. DOI 10.1016/j.smim.2015.11.001.
- Tack G.J., Verbeek W.H., Schreurs M.W., Mulder C.J. The spectrum of celiac disease: epidemiology, clinical aspects and treatment. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2010;7(4):204-213. DOI 10.1038/nrgastro.2010.23.
- Tatham A.S., Shewry P.R. The S-poor prolamins of wheat, barley and rye. *J. Cereal Sci.* 1995;22:1-16.
- Veraverbeke W.S., Delcour J.A. Wheat protein composition and properties of wheat glutenin in relation to breadmaking functionality. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2002;42(3):179-208. DOI 10.1080/10408690290825510.
- Waga J., Skoczowski A. Development and characteristics of ω -gliadin-free wheat genotypes. *Euphytica.* 2014;195:105-116. DOI 10.1007/s10681-013-0984-1.
- Waga J., Zientarski J., Szalaniec M., Obtulowicz K., Dyga W., Skoczowski A. Null alleles in gliadin coding loci and wheat allergenic properties. *Am. J. Plant Sci.* 2013;4(1):160-168. DOI 10.4236/ajps.2013.41021.
- Wang D.W., Li D., Wang J., Zhao Y., Wang Z., Yue G., Liu X., Qin H., Zhang K., Dong L., Wang D. Genome-wide analysis of complex wheat gliadins, the dominant carriers of celiac disease epitopes. *Sci. Rep.* 2017;7:44609. DOI 10.1038/srep44609.
- Wang D., Li F., Cao S., Zhang K. Genomic and functional genomics analyses of gluten proteins and prospect for simultaneous improvement of end-use and health-related traits in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2020;133(5):1521-1539. DOI 10.1007/s00122-020-03557-5.
- Wellner N., Bianchini D., Mills E.N.C., Belton P.S. Effect of selected Hofmeister anions on the secondary structure and dynamics of wheat prolamins in gluten. *Cereal Chem.* 2003;80(5):596-600. DOI 10.1094/CCHEM.2003.80.5.596.
- Wen S., Wen N., Pang J., Langen G., Brew-Appiah R.A., Mejias J.H., Osorio C., Yang M., Gemini R., Moehs C.P., Zemetra R.S., Kogel K.H., Liu B., Wang X., von Wettstein D., Rustgi S. Structural genes of wheat and barley 5-methylcytosine DNA glycosylases and their potential applications for human health. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012;109(50):20543-20548. DOI 10.1073/pnas.1217927109.
- Wieser H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol.* 2007;(2):115-119. DOI 10.1016/j.fm.2006.07.004.
- Wrigley C., Bekes F., Bushuk W. (Eds.). Gliadin and glutenin: the unique balance of wheat quality. St. Paul: AACCI International, 2006.
- Yin K., Gao C., Qiu J.L. Progress and prospects in plant genome editing. *Nat. Plants.* 2017;3:17107. DOI 10.1038/nplants.2017.107.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 04.11.2021. После доработки 25.11.2021. Принята к публикации 29.11.2021.

 pismavavilov.ru

DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-22

Оригинальное исследование

Анализ экспрессии гена Q, контролирующего ряд важных признаков пшениц, включенных в процесс доместикации и селекции

К.А. Головнина¹, А.Г. Блинов^{2, 3}, В.И. Майоров⁴, Н. Ватанабе⁵, Н.П. Гончаров²✉

Аннотация: Анализ экспрессии гена Q, контролирующего основные признаки, по которым человек вел отбор у пшениц (род *Triticum* L.) в процессе доместикации и селекции, показал, что формирование морфологии колоса возделываемых видов пшениц действительно зависит от уровня экспрессии этого гена. На основании результатов работы установлено, что кроме нарушения в позиции 329 Q белка на его функцию и морфологию колоса пшеницы также оказывают влияние другие факторы и гены.

Ключевые слова: пшеница; доместикация; ломкоколосость.

Благодарности: Считаю своим приятным долгом поблагодарить проф. Н. Tsujimoto (Университет г. Тоттори, Япония) за предоставление изогенных линий сорта Chinese Spring. Работа по изучению экспрессии генов поддержана бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН № 0324-2019-0039-С-01, в части изучения селекционного материала (линии 16Н1598 и 16Н1534) работа финансировалась по программе Министерства сельского хозяйства РК (BR10765056).

Для цитирования: Головнина К.А., Блинов А.Г., Майоров В.И., Ватанабе Н., Гончаров Н.П. Анализ экспрессии гена Q, контролирующего ряд важных признаков пшениц, включенных в процесс доместикации и селекции. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;7(4):172-175. DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-22

Original article

Expression analysis of Q gene, controlling of the important domestication and breeding wheat traits

К.А. Golovnina¹, A.G. Blinov^{2, 3}, V.I. Mayorov⁴, N. Watanabe⁵, N.P. Goncharov²✉

Abstract: Analysis of the expression of the Q gene (spelt factor), controlling the main agronomic traits by which a human had selected wheat (*Triticum* L.) during domestication and breeding, showed that the formation of the ear morphology of cultivated wheat species really depends on the level of expression of this gene. Based on the results of these investigation, it was found that in addition to a violation in the 329 Q position of the protein, its function and morphology of the wheat ear are also influenced by other factors and genes.

Key words: wheat; domestication; fragility.

For citation: Golovnina K.A., Blinov A.G., Mayorov V.I., Watanabe N., Goncharov N.P. Expression analysis of Q gene, controlling of the important domestication and breeding wheat traits. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;7(4):172-175. DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-22 (in Russian)

¹ Миллипоре Сигма, Роквилл, Мэриленд, США

US Molecular Operations, Process Solution Services (BioReliance®), MilliporeSigma. Rockville, MD, USA

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

³ Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
Institute of Molecular and Cellular Biology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

⁴ Мерсер университет, Мэйкон, США
Mercer University School of Medicine, Macon GA, USA

⁵ Колледж сельского хозяйства, Университет г. Ибараки, Ибараки, Япония
College of Agriculture, Ibaraki University, Ibaraki, Japan

✉ gonch@bionet.nsc.ru

© Головнина К.А., Блинов А.Г., Майоров В.И., Ватанабе Н., Гончаров Н.П., 2021

Поиск и всестороннее изучение генов, «включенных» в неолитическую революцию, становится все более популярной темой исследований (Doebley et al., 2006; Lev-Yadun et al., 2006; Abbo, Gopher, 2017; и др.). Ген *Q* является одним из генов пшениц (род *Triticum* L.), которые контролируют основные признаки, включенные в доместикацию, а именно «пленчатость-голозерность» и «ломкоколосость» (Tanno, Willcox, 2006; Гончаров и др., 2007а). Контроль этих признаков обуславливает важную роль гена *Q* в широком распространении голозерных видов пшениц – твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.) и мягкой пшеницы (*T. aestivum* L.) в культуре по сравнению с редко возделываемыми в настоящее время пленчатыми видами, такими как спельта (*T. spelta* L.), полба (*T. dicoccum* (Shrank) Schübl. (syn. *T. turgidum* ssp. *dicoccum* (Shrank ex Schübl.) Thell.)), *T. tibetanum* и *T. yunnanense* (Stallknecht et al., 1996; Ионов и др., 2013; Кобылянский и др., 2013; van Slageren, Payne, 2013; Фу Хао, Гончаров, 2019). Однако в последнее время их все чаще используют для получения продуктов функционального питания (Arzani, Ashraf, 2017). Более того, селекционеры создают голозерные аналоги пленчатых видов (Патент..., 2007), запутывая (Смекалова, Кобылянский, 2019) и так непростую таксономию пленчатых пшениц (van Slageren, Payne, 2013).

Недавно была установлена последовательность гена *Q* и показана его гомология гену транскрипционного фактора APETALA2 (*AP2 Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Simons et al., 2006)). Ген локализован в длинном плече хромосом 5-й гомеологической группы пшениц. Основная функциональная роль осталась только у одной копии гена *Q* на хромосоме 5A (Simons et al., 2006; Zhang et al., 2011). Функциональное значение гомологичных локусов на хромосомах 5B и 5D не выяснено. В результате мутационных событий, произошедших в генах геномов В и D, оба транскрипта с В генома и один с D генома оказались нарушенными (Zhang et al., 2011). Однако гомологи гена *Q* у доноров В и D геномов полиплоидных пшениц – диких диплоидных видов эгилопсов – *Aegilops speltoides* Tausch и *Ae. tauschii* Coss. (син. *Ae. squarrosa* L.) продуцируют белок без каких-либо нарушений или повреждений (Ning et al., 2009; Zhang et al., 2011).

Сравнительный анализ последовательностей этого гена у представителей рода *Triticum* с генотипами *qq* (голозерность) и *QQ* (пленчатость)¹ позволил выявить точечную мутацию в белок-кодирующей области (Val329Ile), которая, вероятно, и повлияла на появление признака «голозерность» и формирование ломкого колоса (Simons et al., 2006).

Для выяснения функции гена *Q* у представителей рода, имеющих различную морфологию колоса и наличие/отсутствии мутации Val329Ile, в данной работе был проведен анализ экспрессии гена *Q* у 10 образцов различных видов пшениц трех уровней плоидности (см. таблицу). Эксперименты проводили в режиме реального времени (real-time PCR) по технологии SYBR Green на аппарате Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System. Необходимые пары праймеров были выбраны в программах Primer Premier и Primer 3. Затем проведен градиентный ПЦР для определения оптимальной

температуры отжига праймеров. Для сравнения графиков, полученных при проведении ПЦР в режиме реального времени, был использован пороговый метод (C_t threshold cycle). Выделение РНК проводили по протоколу SV Total RNA Isolation System (Promega).

Исследование экспрессии на разных стадиях развития растений показало наличие взаимосвязи количества синтезируемого продукта гена *Q* с морфологией колоса у двух пар родственных видов: 1) пленчатая *T. dicoccoides* (Körn. ex Aschers. et Graebn.) Schweinf. и голозерная *T. aestivum* L. и 2) пленчатая *T. monococcum* L. и голозерная *T. sinskajae* A. Filat. et Kurk. Экспрессия гена *Q* у голозерных пшениц выше, чем у пленчатых (см. рисунок).

У проростков в фазе третьих листьев ген *Q* экспрессировался активнее у образцов диплоидных видов эгилопсов (*Ae. speltoides*, *Ae. squarrosa*), его высокая активность сохранялась также и у взрослых растений этих видов (см. рисунок). На основе анализа последовательностей гена *Q* и результатах гибридологического анализа было сделано заключение, что форма колоса у эгилопсов и диких диплоидных пшениц не зависит от уровня экспрессии гена *Q*. Все они имеют пленчатый колос и высокую активность гена *Q* по сравнению с тетраплоидной пшеницей *T. dicoccoides*. Взаимосвязь морфологии колоса с количеством продукта гена *Q* прослеживается на примере образцов культурной однозернянки *T. monococcum* и ее голозерного мутанта *T. sinskajae* (*T. sinskajae* – единственный голозерный представитель диплоидных видов (Гончаров и др., 2007б)). Показано, что основные видоспецифические изменения у этого вида произошли в длинном плече хромосомы 5A, где локализован и ген *Q* (Гончаров и др., 2007б). Экспрессия этого гена у данного вида заметно выше, что подтверждает предыдущие данные об увеличении экспрессии гена у голозерных, более компактных форм (Simons et al., 2006). Хотя в настоящее время установлено, что компактность колоса не зависит, как считали ранее, от дозы гена *Q*, а связана с расположенным на близком расстоянии с ним геном *Sp1* (Kosuge et al., 2012). Более того, оба вида содержат Ile в позиции 329 гена *Q*. Это означает что мутация в кодирующей области в данном случае не имеет функционального значения.

Изогенные линии 16H1534 (i: CS*7/*T. spelta*) и 16H1598 (i: CS*7/*T. dicoccoides*) мягкой пшеницы сорта Chinese Spring (CS), полученные H. Tsujimoto (2001), с генами *Q* и *Q^b* от *T. dicoccoides* и *T. spelta* содержат *Q* белок с Val в позиции 329 и спельтоидный, пленчатый фенотип колоса, как и родительские пленчатые формы, от которых получен аллель гена *Q*. Однако на первых этапах развития растения экспрессия гена *Q* у этих линий заметно снижена по сравнению с родительскими формами. При переходе к колошению экспрессия возрастает у изогенной линии CS*7/*T. spelta* и образца KU 3377 *T. spelta* из Ирана, тогда как у изогенной линии CS*7/*T. dicoccoides* и образца PI467005 пленчатого вида *T. dicoccoides* она, напротив, падает (см. рисунок). Полученные данные говорят о разной регуляции гена *Q* и его роли в морфогенезе колоса. Гибридологический анализ показывает, что гены, ответственные за проявление признаков «спельтоидность» и «пленчатость» у изогенных линий с генами *Q* от *T. dicoccoides* и *T. spelta* не аллельны (Sood et

¹ Данные о доминантности-рецессивности приведены в соответствии с данными генетического анализа (Гончаров, 2012).

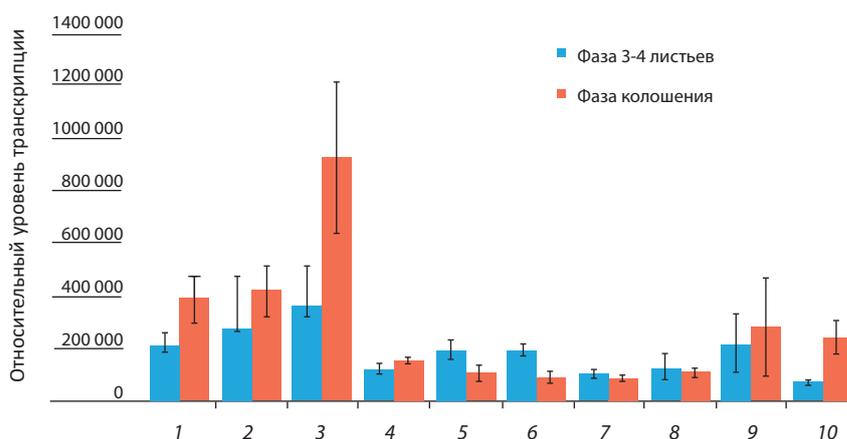
Морфология колоса и варибельная позиция 2094 в последовательности гена Q у видов пшениц и эгилопсов

Вид, образец	Признаки, определяющие морфологию колоса			Полиморфная аминокислота
	Пленчатость	Ломкоколосость	Спельтоидность	329 Val/Ile Экзон 8 2094 п.н.
Ae46566 <i>Ae. speltooides</i>	+	-	+	C
к-865 <i>Ae. tauschii</i>	+	+	+ ¹	C
к-48993 <i>T. sinskajae</i> [?] ²	-	-	-	G
к-18105 <i>T. monococcum</i> [?] ²	+	-	+	G
IG44829 <i>T. urartu</i> [?] ²	+	+	+	G
PI467005 <i>T. dicoccoides</i> [Q ^b] ²	+	+	+	G
16H1598 i: CS*7/ <i>T. dicoccoides</i> [Q ^b] ²	+	+	+	G
<i>T. aestivum</i> сорт Chinese Spring [q] ²	-	-	-	A
KU3377 <i>T. spelta</i> [Q] ²	+	+	+	G
16H1534 i: CS*7/ <i>T. spelta</i> [Q] ²	+	+	+	G

¹ Спельтоидность обусловлена геном *Tg* (Sood et al., 2009; Гончаров, 2012).

² В квадратных скобках обозначение аллелей гена Q на основании результатов генетического анализа согласно (Sormacheva et al., 2015).

[?] – аллельное состояние гена Q не определено (см.: Гончаров и др., 20076; Vavilova et al., 2020).



Уровень экспрессии гена Q у пшениц и эгилопсов в фазе третьих листьев и фазе колошения.

1 – *Ae. speltooides*, 2 – *Ae. tauschii*, 3 – *T. sinskajae*, 4 – *T. monococcum*, 5 – *T. urartu*, 6 – *T. dicoccoides*, 7 – i: CS*7/*T. dicoccoides*, 8 – *T. aestivum* (CS), 9 – *T. spelta*, 10 – i: CS*7/*T. spelta*

al., 2009), однако в последовательности белка Q у них присутствует Val в позиции 329. Показано, что именно замена аминокислоты в этой позиции приводит к появлению неспельтоидного колоса *T. aestivum* и увеличению экспрессии гена Q (Simons et al., 2006).

Ранее экспрессия гена Q была исследована только у замещенной линии *T. aestivum*/5A *T. dicoccoides* и мутантных форм мягкой пшеницы (Simons et al., 2006; Zhang et al., 2011). В результате проведенного нами анализа обнаружено, что действительно его экспрессия у мягкой пшеницы с голозерным, неспельтоидным типом колоса увеличена по сравнению с изогенной линией CS*7/*T. dicoccoides*, характеризующейся пленчатостью и спельтоидным колосом (см. рисунок). Однако у мягкой пшеницы экспрессия гена Q не

превышает уровень экспрессии этого же гена у пленчатого вида *T. spelta*. Поэтому можно сделать вывод о том, что контроль гена Q у двух спельтоидных видов: тетраплоидного *T. dicoccoides* и гексаплоидного *T. spelta* – осуществляется по-разному. Происхождение голозерной мягкой пшеницы от пленчатой *T. dicoccoides* со спельтоидным колосом, так же как и голозерной *T. sinskajae* от пленчатой *T. monococcum*, вполне вероятно связано с наблюдаемым нарушением экспрессии гена Q. В результате синтез большего количества продукта, кодируемого геном Q, привел к изменениям морфологии колоса. В то время как эволюция его функции у *T. spelta* шла независимо.

На основе полученных результатов мы не можем подтвердить вывод о том, что именно описанная мутация в по-

зиции 329 у мягкой пшеницы приводит к смене фенотипа и связана с регуляцией экспрессии и количеством продукта (Simons et al., 2006). Более подробные исследования локуса Q в геномах A, B и D подтверждают, что на экспрессию и функцию гена Q влияет не только мутация Val329Ile в A геноме, но также и комбинация мутаций и аллелей в локусах B и D геномов (Zhang et al., 2011).

Следует отметить, что замена в позиции 329 у полиплоидных пшениц приводит к смене фенотипа, в то время как у диплоидных видов пшениц – не приводит.

Список литературы / References

Гончаров Н.П. Сравнительная генетика пшениц и их сородичей. Изд. 2-е, испр. и доп. Новосибирск: Акад. изд-во «Гео», 2012.
[Goncharov N.P. Comparative Genetics of Wheats and their Related Species. 2nd edn. Academic Publ. House "Geo", 2012. (in Russian)]

Гончаров Н.П., Глушков С.А., Шумный В.К. Доместикация злаков Старого Света: поиск новых подходов для решения старой проблемы. *Журнал общей биологии*. 2007а;68(2):126-148.
[Goncharov N.P., Glushkov S.A., Shumny V.K. Domestication of cereal crops in the old world: in search of a new approach to solving old problem. *Zhurnal Obshchey Biologii = Biology Bulletin Reviews*. 2007а;68(2):126-148. (in Russian)]

Гончаров Н.П., Кондратенко Е.Я., Банникова С.В., Коновалов А.А., Головнина К.А. Сравнительно-генетический анализ голозерной диплоидной пшеницы *Triticum sinskajae* и ее исходной формы *T. monococcum*. *Генетика*. 2007б;43(11):1491-1500. DOI 10.1134/S1022795407110075.
[Goncharov N.P., Kondratenko E.J., Bannikova S.V., Kononov A.A., Golovnina K.A. Comparative genetic analysis of diploid naked wheat *Triticum sinskajae* and the progenitor *T. monococcum* accession. *Russ. J. Genet.* 2007б;43(11):1248-1256. DOI 10.1134/S1022795407110075.]

Ионов Э.Ф., Мережко А.Ф., Тимербекова С.К., Ионова Н.Э. Характеристика новой крупяной культуры-голозерной полбы, сорт Гремма. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2013;171:287-288.
[Ionov E.F., Merezko A.F., Temirbekova S.K., Ionova N.E. Characteristics of a new cereal crop-naked spelt, Gremme variety. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Seleksii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 2013;171:287-288. (in Russian)]

Кобылянский В.Д., Сурин Н.А., Попова Н.М. Агробиологическая оценка образцов голозерной полбы в условиях Красноярской лесостепи. *Фундаментальные исследования*. 2013;3(10):601-605.
[Kobylyansky V.D., Surin N.A., Popova N.M. The agrobiologic evaluation of samples spelt in conditions Krasnoyarsk forest steppe. *Fundamentalnye Issledovaniya = Fundamental Research*. 2013;3(10):601-605. (in Russian)]

Патент на селекционное достижение № 4782 Российская Федерация. Пшеница полба (*Triticum turgidum* L. subsp. *dicoccum* (Schrank ex Schübl.) Thell.). Сорт Руно: № 47176: заявл. 15.01.2007 / Л.И. Шуровенкова, Н.А. Анфилова, А.Ф. Мережко, Л.А. Беспалова, И.Н. Кудряшов, А.В. Васильев, А.Н. Боровик, О.П. Митрофанова; заявитель Национальный центр зерна им. П.П. Лукьяненко, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова.
[Patent for breeding achievement No. 4782 Russian Federation. Emmer wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *dicoccum* (Schrank ex Schübl.) Thell.). Cv. Runo: No. 47176: application No. 15.01.2007 / L.I. Shurovenkova, N.A. Anfiova, A.F. Merezko, L.A. Bespalova, I.N. Kudryashov, A.V. Vasiliev, A.N. Borovik, O.P. Mitrofanova; applicant National Grain Center named after P.P. Lukyanenko, Federal Research Center N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources. (in Russian)]

Смекалова Т.Н., Кобылянский В.Д. Новый подвид пшеницы *Triticum dicoccon* (Schrank) Schuebl. subsp. *nudicoccon* Kobyl. et

Smekal. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2019;180(4):148-151. DOI 10.30901/2227-8834-2019-4-148-151.
[Smekalova T.N., Kobylyansky V.D. A new subspecies of wheat: *Triticum dicoccon* (Schrank) Schuebl. subsp. *nudicoccon* Kobyl. et Smekal. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Seleksii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 2019;180(4):148-151. DOI 10.30901/2227-8834-2019-4-148-151. (in Russian)]

Фу Хао, Гончаров Н.П. Эндемичные пшеницы Китая как ресурсы селекции. *Генетичні ресурси рослин*. 2019;25:11-25. DOI 10.36814/pgr.2019.25.01.
[Fu Hao, Goncharov N.P. Endemic wheat of China as breeding resources. *Plant Genetic Resources*. 2019;25:11-25. DOI 10.36814/pgr.2019.25.01. (in Russian)]

Abbo S., Gopher A. Near Eastern plant domestication: a history of thought. *Trends in Plant Science*. 2017;22(6):491-511. DOI 10.1016/j.tplants.2017.03.010.

Arzani A., Ashraf M. Cultivated ancient wheats (*Triticum* spp.): A potential source of health-beneficial food products. *Comprehensive Reviews Food Science Food Safety*. 2017;16(3):477-488. DOI 10.1111/1541-4337.12262.

Doebley J. Unfallen grains: how ancient farmers turned weeds into crops. *Science*. 2006;312(5778):1318-1319. DOI 10.1016/j.cell.2006.12.006.

Kosuge K., Watanabe N., Melnik V.M., Laikova L.I., Goncharov N.P. New sources of compact spike morphology determined by the genes on chromosome 5A in hexaploid wheat. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2012;59(6):1115-1124. DOI 10.1007/s10722-011-9747-9.

Lev-Yadun S., Gopher A., Abbo S., Hartmann A., Kislev M.E., Weiss E. How and when was wild wheat domesticated? *Science*. 2006;313(5785):296.

Ning S.-Z., Chen Q.-J., Yuan Z.-W., Zhang L.-Q., Yan Z.-H., Zheng Y.-L., Liu D.-C. Characterization of *WAP2* gene in *Aegilops tauschii* and comparison with homoeologous loci in wheat. *J. Syst. Evol.* 2009;47:543-551. DOI 10.1111/j.1759-6831.2009.00048.x.

Simons K.J., Fellers J.P., Trick H.N., Zhang Z., Tai Y.S., Gill B.S., Faris J.D. Molecular characterization of the major wheat domestication gene *Q*. *Genetics*. 2006;172:547-555. DOI 10.1534/genetics.105.044727.

Sood S., Kuraparthi V., Bai G., Gill B.S. The major threshability genes soft glume (*sog*) and tenacious glume (*Tg*), of diploid and polyploid wheat, trace their origin to independent mutations at non-orthologous loci. *Theor. Appl. Genet.* 2009;119:341-351. DOI 10.1007/s00122-009-1043-0.

Sormacheva I., Golovnina K., Kosuge K., Watanabe N., Blinov A., Goncharov N.P. Q gene variability in wheat species with the different spike morphology. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2015;62(6):837-852. DOI 10.1007/s10722-014-0195-1.

Stallknecht G.F., Gilbertson K.M., Ranney J.E. Alternative wheat cereals as food grains: einkorn, emmer, spelt, kamut, and triticale. In: J. Janick (Ed.) *Progress in new crops*. ASHS Press, Alexandria, 1996;156-170.

Tanno K., Willcox G. How fast was wild wheat domesticated? *Science*. 2006;311:1886. DOI 10.1126/science.1124635.

Tsujimoto H. Production of near-isogenic lines and marked monosomic lines in common wheat (*Triticum aestivum*) cv. Chinese Spring. *J. Hered.* 2001;93(3):254-259. DOI 10.1093/jhered/92.3.254.

van Slageren M., Payne T. Concepts and nomenclature of the farro wheats, with special reference to emmer, *Triticum turgidum* subsp. *dicoccum* (Poaceae). *Kew Bull.* 2013;68:477-494.

Vavilova V., Konopatskaia I., Blinov A., Kondratenko E.Ya., Kruchinina Y.V., Goncharov N.P. Genetic variability of spelt factor gene in *Triticum* and *Aegilops* species. *BMC Plant Biol.* 2020;20(Suppl. 1):310. DOI 10.1186/s12870-020-02536-8.

Zhang Z., Belcram H., Gornicki P., Charles M., Just J., Huneau C., Magdelenat G., Couloux A., Samain S., Gill B.S., Rasmussen J.B., Barbe V., Faris J.D., Chalhouf B. Duplication and partitioning in evolution and function of homoeologous Q loci governing domestication characters in polyploid wheat. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2011;108:18737-18742. DOI 10.1073/pnas.1110552108.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 26.10.2021. После доработки 09.11.2021. Принята к публикации 11.11.2021.

 pismavavilov.ru

DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-23

Оригинальное исследование

Получение трансгенных линий мышей для изучения возможности конверсии лактозы в галактоолигосахариды в молочной железе

А.В. Смирнов✉, А.Н. Кораблев, А.М. Юнусова, Т.А. Шнайдер, И.А. Серова

Аннотация: Современные методы трансгенеза позволяют проводить сложные модификации геномов животных для различных задач. В биотехнологии создают трансгенных животных с модификациями молока, в том числе с улучшенными антибактериальными свойствами, измененным липидным составом или новыми вкусовыми качествами. Одним из перспективных направлений в этой области можно назвать оверэкспрессию β -галактозидаз – ферментов, разлагающих лактозу, – для удаления лактозы из молока сельскохозяйственных животных. В нашей работе мы исследуем подход с экспрессией трансгалактазилирующего фермента молочнокислой бактерии *Lactobacillus delbrueckii*. В теории синтез этого фермента в молочной железе мыши должен приводить к исчезновению в молоке лактозы благодаря ее конверсии в галактоолигосахариды. Мы создали две трансгенные линии животных для тестирования этой гипотезы. На первом этапе протестировали различные варианты генетических конструкций, включая сигналы локализации в аппарат Гольджи, и выбрали два варианта гена β -галактозидазы под конститутивным и казеиновым промоторами для получения трансгенных линий мышей методом пронуклеарной микроинъекции. Для каждой из конструкций было получено по четыре трансгенных фаундера. Мы провели предварительный анализ характеристик трансгенных линий (копийность трансгена, экспрессия, наследование трансгена) и собрали молоко от лактирующих самок для дальнейших исследований.

Ключевые слова: трансгенез; молоко; лактоза; галактоолигосахариды; аппарат Гольджи.

Благодарности: Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках реализации проекта № 20-316-80001. Авторы выражают благодарность ЦКП микроскопии анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН.

Для цитирования: Смирнов А.В., Кораблев А.Н., Юнусова А.М., Шнайдер Т.А., Серова И.А. Получение трансгенных линий мышей для изучения возможности конверсии лактозы в галактоолигосахариды в молочной железе. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;7(4):176-193. DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-23

Original article

Generating transgenic mice for investigating direct lactose conversion into galactooligosaccharides in mammary gland

A.V. Smirnov✉, A.N. Korablev, A.M. Yunusova, T.A. Shnaider, I.A. Serova

Abstract: Present day transgenesis tools make it possible to carry out quite complex modifications of animal genomes for different goals. In biotechnology, transgenic animals are generated to modify the composition of milk, including antibacterial properties, lipid composition, or flavor. One of the promising directions in this area is the overexpression of β -galactosidases, enzymes that hydrolyze lactose, to remove this disaccharide from the milk of farm animals. In our work, we investigate an approach with the expression of the transgalactosylating enzyme of the lactic acid bacterium *Lactobacillus delbrueckii*. In theory, the synthesis of this enzyme in the mouse mammary gland should lead to the disappearance of lactose from milk, due to its conversion into galactooligosaccharides. We created two transgenic animal lines to test this hypothesis. At the first stage, we tested variants of genetic constructs, including Golgi localization signals, and selected two variants of the β -galactosidase transgene under the constitutive and casein promoters to obtain transgenic mouse strains by pronuclear microinjection. For each of the constructs, four transgenic founders were obtained. We carried

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

 hldn89@gmail.com

© Смирнов А.В., Кораблев А.Н., Юнусова А.М., Шнайдер Т.А., Серова И.А., 2021

out a preliminary analysis of the characteristics of transgenic lines (transgene copy number, expression, inheritance of the transgene) and collected milk from lactating females for further research.

Key words: transgenesis; milk; lactose; galactooligosaccharides; Golgi apparatus.

For citation: Smirnov A.V., Korablev A.N., Yunusova A.M., Shnaider T.A., Serova I.A. Generating transgenic mice for investigating direct lactose conversion into galactooligosaccharides in mammary gland. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;7(4):196-193. DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-23 (in Russian)

Введение

Современный уровень развития биотехнологии и методов редактирования генома уже сейчас позволяет изменять свойства молока сельскохозяйственных животных – коров, коз, кроликов (Shepelev et al., 2018; Kalds et al., 2019), например, для улучшения его антимикробных свойств (Cooper et al., 2015), липидного (Wang et al., 2015) или белкового состава (Laible et al., 2016). Трансгенез животных изучают также с целью превращения молочной железы в биореактор ценных рекомбинантных белков человека (Shepelev et al., 2018), в том числе и в нашей лаборатории (Serova et al., 2012; Burkov et al., 2013). Одним из перспективных направлений биотехнологических исследований является создание животных с безлактозным молоком.

Молоко почти всех животных содержит большое количество дисахарида лактозы, который составляет примерно 30 % калорий молока. За гидролиз лактозы на глюкозу и галактозу отвечает фермента лактаза (Arribas et al., 2000). Известно, что уровень экспрессии этого фермента падает с возрастом у всех млекопитающих, включая человека, что приводит к синдрому «лактазная недостаточность» и затрудняет усвоение лактозы (Fassio et al., 2018). В некоторых человеческих популяциях произошли регуляторные мутации, активирующие экспрессию лактозы в течение всей жизни (Fang et al., 2012; Ségurel, Bon, 2017). Благодаря своей полезности эти мутации были поддержаны отбором, однако за относительно недолгий срок (около 3–6 тыс. лет) они еще не успели широко распространиться. В настоящий момент больше половины всех людей страдают от лактазной недостаточности во взрослом состоянии (Ingram et al., 2009), что выражается в нарушениях пищеварения при употреблении молока.

За синтез и гидролиз лактозы отвечают соответственно ферменты лактоз-синтаза и лактаза. Лактоз-синтаза имеет полное название β -1,4-галактозилтрансфераза (β 4Gal-T1) и относится к семейству галактозилтрансфераз (Gal-T) (EC 2.4.1.22). В обычных условиях лактоз-синтаза β 4Gal-T1 катализирует перенос моносахарида галактозы от UDP-галактозы на акцепторные молекулы: гликолипиды, пептидогликаны, гликопептиды – в аппарате Гольджи (Gabiuis, 2018). Эти модификации (N-гликозилирование) регулируют многие биологические процессы, включая внутриклеточный транспорт, межклеточные взаимодействия, синтез антител, фолдинг белков, формирование внеклеточного матрикса (Mihov, Spiess, 2015; Tannous et al., 2015; Gulati, Poluri, 2016). В период же лактации β 4Gal-T1 формирует лактоз-синтазный комплекс с белком-кофактором α -лактальбумином (LALBA) в молочной железе (Neville, 2009). Это приводит к изменению субстрат-специфичности β 4Gal-T1 и присоеди-

нению галактозы к глюкозе с образованием дисахарида лактозы. Лактаза относится к ферментам класса β -галактозидаз (lactase/phlorizin hydrolase) (EC 3.2.1.23), которые катализируют отщепление концевых галактозных остатков от сахарных остовов различной длины (Liu et al., 2017). Лактаза расщепляет гликозидную β -1,4 связь, образованную лактоз-синтазой. У млекопитающих лактаза локализуется на клеточной мембране эпителия кишечника.

Знания о молекулярных механизмах синтеза и гидролиза лактозы могут быть использованы для создания трансгенных линий животных с измененным составом молока. Мы решили оценить перспективы такого подхода, создав трансгенных мышей с экспрессией бактериального гена, превращающего лактозу в галактоолигосахариды (ГОС) (Nguyen et al., 2012), так как этот вариант модификации молока относительно прост с точки зрения белковой инженерии и в то же время очень актуален для молочной индустрии (Vera et al., 2016; Xiao et al., 2019). Современные промышленные способы получения безлактозного молока основаны на обработке молока-сырья β -галактозидазой (лактазой) для удаления лактозы. Для того чтобы получить ГОС, используют β -галактозидазы с высокой трансгалактозилазной активностью (Xiao et al., 2019). Это означает, что они катализируют перенос остатка галактозы на лактозу (Saqib et al., 2017). Этот процесс приводит к замещению в молоке лактозы на другие сахара, включая олигосахариды, состоящие из 3–6 остатков галактозы. Галактоолигосахариды стимулируют полезную микрофлору кишечника и обладают сладким вкусом, поэтому молоко и молочные продукты с ГОС имеют высокую пищевую ценность.

Материал и методы

Клонирование генетических конструкций

Ген LacZ* (GeneID: 4085367) был синтезирован в компании Cloning Facility (Россия) вместе с перекрывающимися плечами 20 п.о. для клонирования в реакции Гибсона. Фрагмент был смешан с остальными ПЦР-фрагментами: геном Clover (Addgene #40259), HA-тагом и бэкбоном плазмиды pCAGGS-mCherry (EcoRI/BglIII). Все фрагменты объединялись в одной реакции в соотношении 1:1:1:1. Фрагменты сигнальных пептидов клонировались в сайт EcoRI плазмиды pCAGGS-Cherry (Addgene #41583) методом Гибсона (NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix (NEB #E2621)). Для этого ПЦР-продукты, амплифицированные с кДНК мыши, смешивали с линейризованной плазмидой в соотношении 1:1 в 10 мкл микса. Для получения конструкции LacZ* без Clover исходную плазмиду обрабатывали AgeI, очищали через гель и религирировали по липким концам. Клонирование конструкции LacZ* с казеиновыми регуляторными элементами, использованной

для микроинъекций, было выполнено на основе вектора pGoatcasGMCSF, опубликованного ранее (Burkov et al., 2013).

Тестирование конструкций на клетках

Колокализацию флуоресцентного сигнала анализировали на клетках двух типов: HEK293T и первичных фибробластах мыши (линия OG2). В обоих случаях клетки трансфицировались липофектаминоном 3000 (Thermo Fisher Scientific) и свечение плазмид детектировалось после 48 ч на микроскопе ZOE Fluorescent Cell Imager (BioRad) или конфокальном микроскопе LSM 780 NLO (Zeiss).

Для иммунофлуоресцентного окрашивания первичные фибробласты мыши (линия OG2) были посажены на стекла с плотностью 40 тыс. клеток на 1 см². Клетки трансфицировались различными вариантами плазмид mCherry-NA с помощью реагента TransFast™ (Promega). Через 30 ч после трансфекции клетки были зафиксированы в 4 % параформальдегиде. После промывки 1× PBS клетки инкубировали в блокирующем растворе: 2 % BSA (Sigma Aldrich), 0.2 % Triton X-100 (Amresco), 5 % FBS (Capricorn Scientific). Затем проводили окрашивание первичными антителами на HA-таг (1:1000) (# 26183, Thermo Fisher Scientific) и Golgin-97 (1:1000) (# PA5-30048, Thermo Fisher Scientific) в течение 5 ч на орбитальном шейкере. После этого клетки трижды промывали 1× PBS и затем окрашивали вторичными антителами (1:1000) (#A12135, #A11034, Thermo Fisher Scientific). Иммунофлуоресценцию детектировали на конфокальном микроскопе LSM 780 NLO (Zeiss).

Для проведения Вестерн блоттинга клетки HEK293 были трансфицированы шестью плазмидами LacZ* на 6w-плашке и собирались без сортировки на второй день после трансфекции (эффективность трансфекции 10–20 %). Осадок из нескольких миллионов клеток ресуспендировался в RIPA буфере (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 % Triton X100, 0.5 % sodium deoxycholate, 0.1 % SDS) и озвучивался для разрушения клеток. Концентрацию тотального белка в лизате оценивали китом Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). На белковый SDS-PAGE форец наносили по 15 мкг тотального белка для каждого образца. Белки разгоняли в 10 % геле и переносили на PVDF мембрану. Мембрану сначала обратимо окрашивали для детекции тотального белка (Pierce™ Reversible Protein Stain Kit for PVDF Membranes (Thermo Fisher Scientific)), а затем последовательно инкубировали с первичными антителами на HA-таг (# 26183, Thermo Fisher Scientific) (1:1000) (ночь при 4°C) и вторичными антителами с пероксидазой хрена (HRP) (1:1000) (sc-2357 SCBT) в течение 2 ч при 25°C. Результаты Вестерн блоттинга анализировали китом ECL substrate solution (Millipore) на приборе Chemidoc XRS Imaging system (Bio-Rad).

Для анализа β-галактозидазной активности методом X-gal трансфицированные HEK293 фиксировали 4 % параформальдегидом, промывали 1× PBS и инкубировали в среде с X-gal (1 мг/мл) в течение 16 ч при температуре 37 °C.

Пронуклеарные микроинъекции и детекция трансгенных животных

Обе конструкции были вырезаны из плазмидных бэббонов по соответствующим сайтам рестрикции (рис. 1) и очищены выделением из агарозного геля и на магнитных частицах

AMPure XP (Beckman Coulter #A63880). Для инъекций ДНК разводили в ТЕ-буфере до концентрации 10 нг/мкл. Это соответствует примерно 1000–2000 копий трансгена на один пронуклеус. Раствор инъецировали в пронуклеусы зигот (C57BL/6 генотип) с помощью прибора Transjector 5246 (Eppendorf). Зиготы культивировали 1 ч в среде M16 на 37 °C при 5 % CO₂. Выжившие зиготы подсаживали в яйцеводы псевдобеременным самкам CD-1.

Геномную ДНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции из кончика хвоста. Генотипирование проводили с помощью кита HS-Taq (+MgCl₂) (Биолабмикс) и праймеров на ген LacZ* (AAGAGGAGCAATATCAATGCCGT, CTGTCCGGTCTGCAAACACGAG) (5'-3').

Работа по получению трансгенных животных была выполнена на базе SPF-вивария ИЦиГ СО РАН (RFMEFI61914X0005, RFMEFI61914X0010). Все эксперименты были одобрены этическим комитетом по защите животных ИЦиГ СО РАН в соответствии с документами и рекомендациями Министерства здравоохранения РФ (2010/708n/RF), NRC и FELASA.

Определение копийности с помощью капельной цифровой ПЦР (ddPCR)

Чтобы определить копийность встроок трансгенов у животных, мы использовали цифровую ПЦР на базе кита ddPCR Supermix for Probes (No dUTP) и прибора QX100 ddPCR Systems (Bio-Rad) по рекомендациям производителя. Одна 20 мкл реакция содержала 1× ddPCR Supermix, 900 нМ праймеров, 250 нМ зондов и 20 нг геномной ДНК, обработанной рестриктазой HindIII. Копийность трансгена LacZ* рассчитывали на основе референсного гена *Emid1* (одна копия в гаплоидном геноме). Цифровую ПЦР проводили по следующей программе: 95 °C в течение 10 мин, затем 40 циклов из 95 °C – 30 с и 55 °C – 1 мин; с финальным шагом 98 °C – 7 мин и 20 °C – 30 мин. Все шаги имели скорость нагрева 2 °C/с. Данные анализировали, используя программу QuantaSoft (Bio-Rad, USA). Последовательности праймеров и зондов (5'-3'): *Emid1* (GCCAGGACTGGGTAGCAC, AGGAGGCTCCTGAATTTGTGACAAG, FAM-CCTGGGTCATCT-GAGCTGAGTCC-BHQ1), LacZ* (GATCTGGCGCCTATACAGCCT, CTGTCCGGTCTGCAAACACGAG, HEX-CGGCCCACAGACTAC-GAGTTCTGCGG-BHQ2).

Анализ экспрессии с помощью ОТ-ПЦР и ddPCR

Для выделения РНК органы помещали в 2 мл пробирки с 1 г керамических частиц Lysing Matrix A (MP Biomedicals) и 500 мкл TRI Reagent (Sigma-Aldrich). Гомогенизацию органов проводили с помощью прибора SuperFastPrep-2™ (MP Biomedicals). Далее РНК выделяли в соответствии с протоколом производителя TRI Reagent (Sigma-Aldrich). Перед проведением обратной транскрипции (ОТ) РНК обрабатывали ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific). Обратную транскрипцию осуществляли китом RevertAid RT (Thermo Fisher Scientific) с использованием 500 нг РНК на 20 мкл реакции и случайными праймерами. ОТ-ПЦР анализ проводили с 0.5 мкл реакции обратной транскрипции и праймерами на ген LacZ* (GATCTGGCGCCTATACAGCCT, CTGTCCGGTCTGCAAACACGAG) и ген Rpl4 (GGCTGCTCCCT-CAAGAGTA, AATCTTCTTGGCTGGTGCTC) (5'-3'). Для оценки экспрессии LacZ* методом капельной цифровой ПЦР

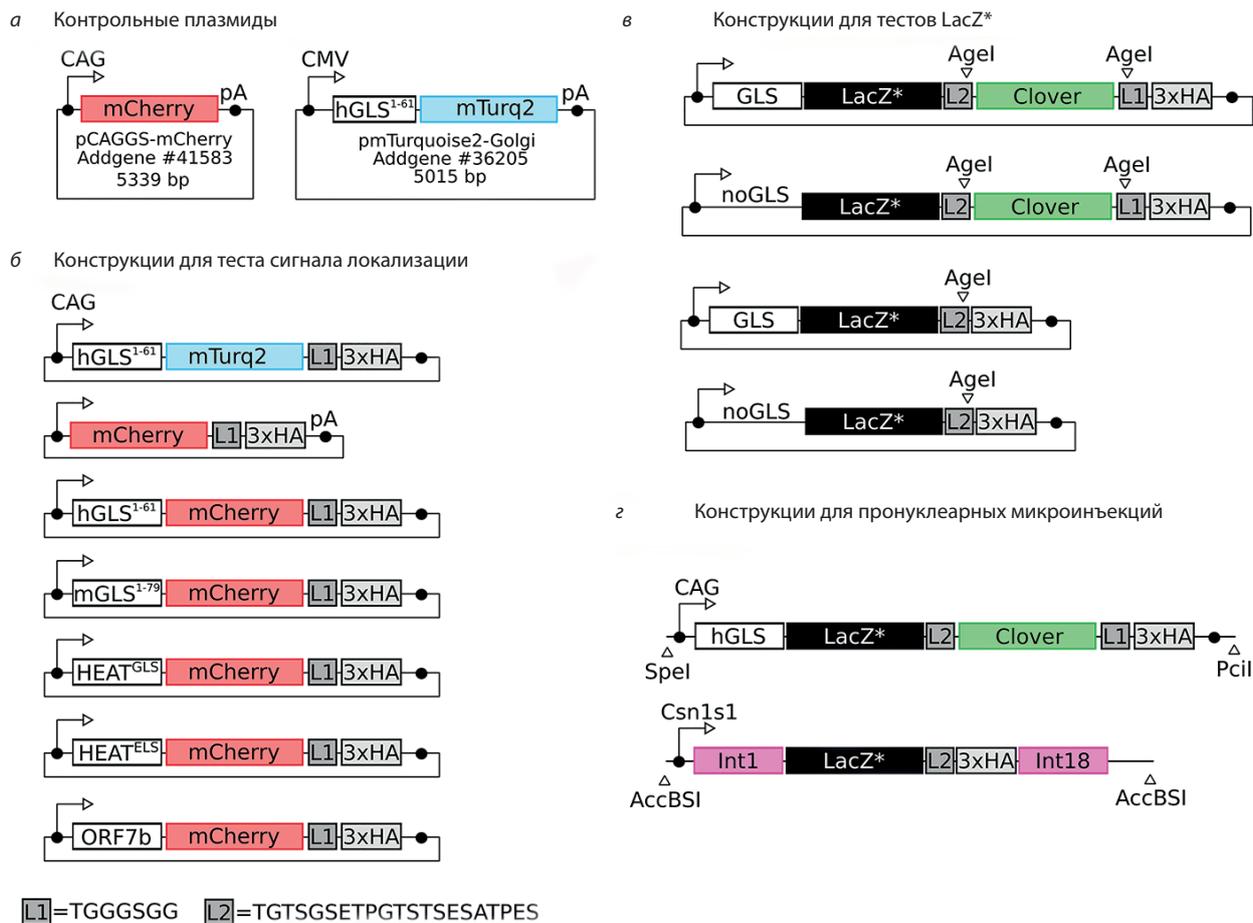


Рис. 1. Схема генетических конструкций, использованных в работе: *а* – конструкции были созданы на основе плазмиды pCAGGS-mCherry и pmTurquoise2-Golgi; *б* – плазмиды для анализа функций сигналов локализации в АГ. Сверху контрольная плаزمида, которая маркирует АГ (mTurq2). Ниже – изучаемые сигнальные пептиды, слитые с белком Cherry. L1, L2 – пептидные линкеры и их последовательности; *в* – дополнительная проверка выбранных сигналов локализации в АГ (mGLS, hGLS) в составе белка LacZ*; *г* – две конструкции LacZ*, подготовленные для пронуклеарных микроинъекций. Конструкция CAG-hGLS-LacZ*-Clover-HA. Ген LacZ* слит с сигналом локализации в АГ hGLS, геном Clover и HA-тагом для детекции антителами. Экспрессия идет с сильного промотора CAG. Трансген вырезан из плазмиды по сайтам SpeI и PciI. Размер итогового фрагмента 6204 п.о. Конструкция Csn1s1-mGLS-LacZ*-HA: ген LacZ* слит с сигналом локализации в АГ mGLS и HA-тагом без гена Clover. Экспрессия идет с «молочного» промотора гена Csn1s1 козы. Розовые прямоугольники – регуляторные интроны Csn1s1 из козы и быка. Трансген вырезан из плазмиды по сайтам AccBSI. Размер итогового фрагмента 8550 п.о.

(ddPCR) применяли тот же протокол, что и для подсчета копийности. Отличием было то, что использовали кДНК (0.5 мкл на реакцию) и другой референсный ген (Rpl4). Последовательности праймеров и зондов (5'-3'): Rpl4 (GGCTGCTCCCTCAAGAGTA, AATCTTCTTGCGTGGTGCTC, FAM-AGCCAGAAATCCAAGAGCCCTCC-BHQ1), LacZ* (GATCTGGC-GGCCTATACAGCCT, CTGTCCGGTCTGCAAACACGAG, HEX-CG-GCCACAGACTACGAGTCTGCGG-BHQ2).

Результаты

Клонирование генетических конструкций

В качестве ГОС-синтезирующей β-галактозидазы мы выбрали один из охарактеризованных ранее ферментов с высокой трансгалактозилазной активностью. Это ген из бактерии *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus DSM 20081* (GenelD: 4085367) (Nguyen et al., 2012). Далее в тексте этот ген обозначен как LacZ*, чтобы избежать возможной

путаницы с геном *Escherichia coli*, часто используемым в биологических экспериментах. *In vitro* в оптимальных условиях он способен конвертировать более 90 % лактозы в ГОС и моносахариды (Nguyen et al., 2012). Ген LacZ* длиной 3024 пар оснований был синтезирован и кодон-оптимизирован для экспрессии в клетках мышей и встроено в плазмиду pCAGGS (Gurtan et al., 2012).

Синтез многих компонентов молока, включая и лактозу, происходит в аппарате Гольджи (АГ) с последующей секрецией в просвет протока молочной железы, поэтому для оптимальной активности фермента LacZ* необходимо обеспечить его локализацию в аппарате Гольджи. Мы протестировали сигналы локализации белков в АГ, соединив их с флуоресцентным белком mCherry (см. рис. 1, *а, б*). Нами были выбраны известные ранее домены различных белков: фрагмент β-1,4-галактозилтрансферазы 1 (B4GALT1) мыши (1-79 а.к.) ("mGLS"); фрагменты mTOR мыши, содержащие

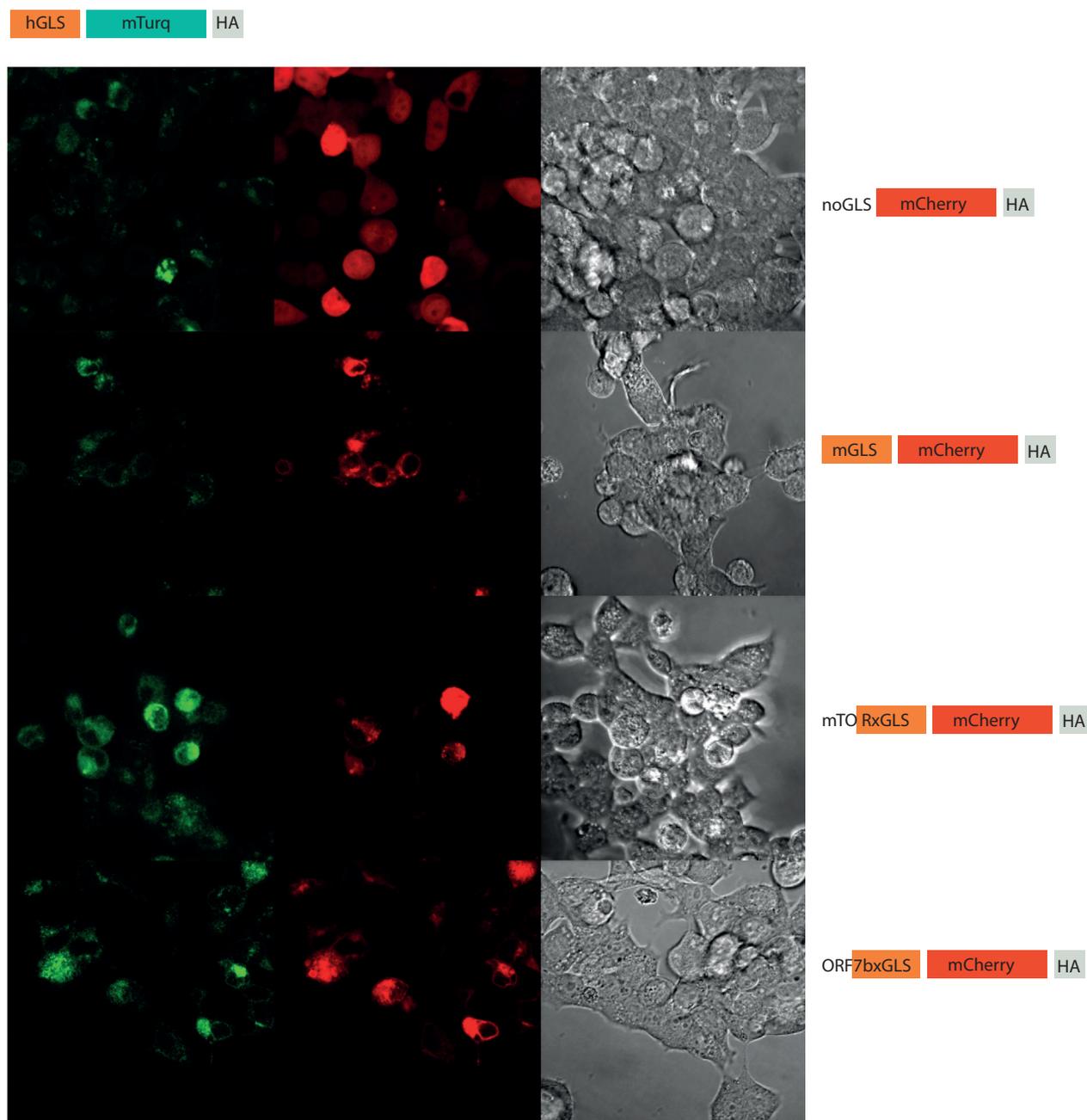


Рис. 2. Тестирование сигналов локализации в аппарате Гольджи в клетках HEK293. hGLS-mTurq-HA – контрольная плаزمида для маркирования АГ; noGLS – вариант без сигнала локализации (белок распределен по всей клетке); mGLS, mTORxGLS, ORF7bxGLS – альтернативные варианты сигнала локализации в аппарате Гольджи

HEAT-повторы (931-1039 и 941-1039 а.к.) (“mTORxGLS”, “mTORxELS”); фрагмент SARS-CoV ORF7b (9-30 а.к.) (“ORF7bxGLS”). Эти фрагменты были ПЦР-амплифицированы с кДНК мыши или синтезированы олигами (ORF7b). Итоговые конструкции клонировали на базе плазмиды pCAGGS-Cherry с помощью метода Гибсона. Для контроля использовали плазмидную конструкцию hGLS-mTurq-HA, на основе плазмиды pmTurquoise2-Golgi, заказанной с Addgene (#36205) (см. рис. 1, а), и также перенесенную в плазмиду pCAGGS. Контрольная плазмида кодирует флуоресцентный

белок mTurquoise (зеленоватое свечение), слитый с сигналом локализации в АГ из B4GALT1 человека (1-61 а.к.) (Goedhart et al., 2012). Во всех конструкциях присутствует HA-таг на С-конце для детекции белков.

Синтезированный ген LacZ* был дополнительно модифицирован. К нему добавили различные сигналы локализации, а также ген Clover для детекции в клетках и тканях животных (см. рис. 1, в). Так как линкерные последовательности плазмид включали сайты рестрикции AgeI, мы могли получить укороченный вариант конструк-

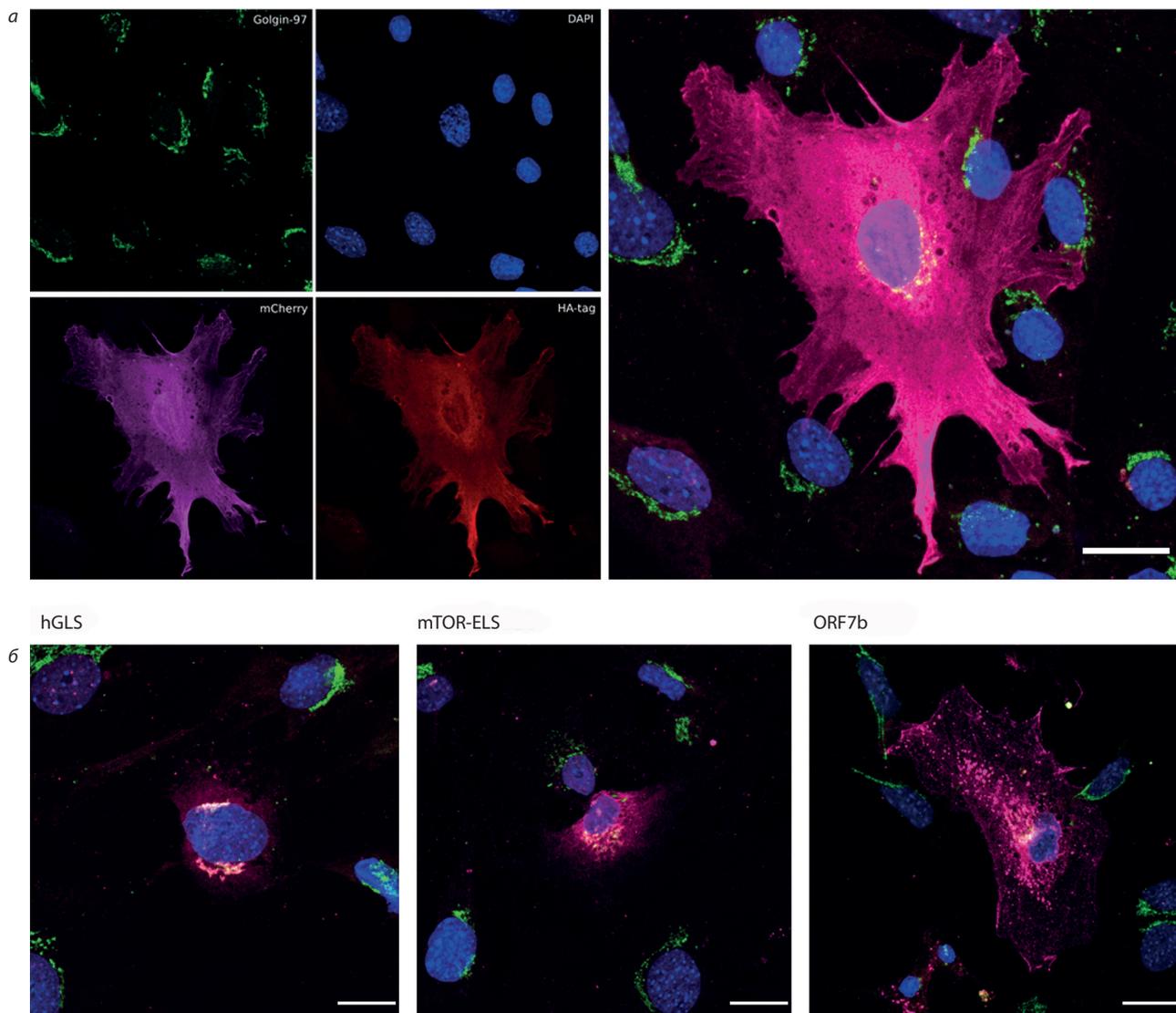


Рис. 3. Иммунофлуоресцентный анализ таргетирования белка mCherry в АГ фибробластов мыши: *а* – клетки, трансфицированные плазмидой mCherry без сигнала локализации. Зеленый сигнал – антитела на Golgin-97, маркер транс-отдела АГ. Розовый сигнал – флуоресценция mCherry. Красный сигнал – HA-таг. Синий сигнал – DAPI; *б* – варианты сигналов локализации. Масштабный отрезок – 20 мкм

ции без Clover в одну стадию. Подготовленные конструкции (варианты mCherry и LacZ*) были предварительно протестированы в культурах клеток.

Тестирование генетических конструкций на клетках

Мы поставили плазмидные трансфекции на клетках человека HEK293 (рис. 2, 1П и 2П) и фибробластах мыши (рис. 3П) и проанализировали свечение флуоресцентных белков. Как видно на рис. 2, контрольный зеленый белок mTurquoise с сигналом hGLS локализуется в небольшие клампы и гранулы рядом с ядром, что соответствует расположению аппарата Гольджи. Красный белок mCherry без сигналов GLS распределен по всей цитоплазме клетки (см. рис. 2, верх). Белок mCherry с мышинным сигналом локализации mGLS (см. рис. 2) всегда локализовался вместе с контрольным сигналом hGLS, из чего можно заключить, что они имеют идентичные свойства. Сигналы из mTOR (mTORxGLS и mTORxELS) и из вирусного белка ORF7b показали в целом похожую на

hGLS картину колокализации, однако их колокализация с mTurq была однозначной не во всех клетках. Плазмиды с LacZ* также демонстрировали схожий паттерн (см. рис. 1П и 2П).

Мы также протестировали таргетирование белков в АГ с использованием антител на HA-таг и Golgin-97, белок-маркер транс-отдела аппарата Гольджи. Иммунофлуоресцентный анализ трансфицированных первичных фибробластов мыши методом конфокальной микроскопии позволил с высокой точностью локализовать белки. Как видно на рис. 3, *а*, белок mCherry без сигнала локализации распределен по всей цитоплазме клетки, а при наличии определенных сигналов таргетируется в различные компартменты (см. рис. 3, *б*). Важно, что hGLS-mCherry идеально колокализуется с транс-отделом аппарата Гольджи. Для дальнейшей работы вариации этого сигнала (hGLS, mGLS) были присоединены к гену LacZ* (см. рис. 1, *в*).

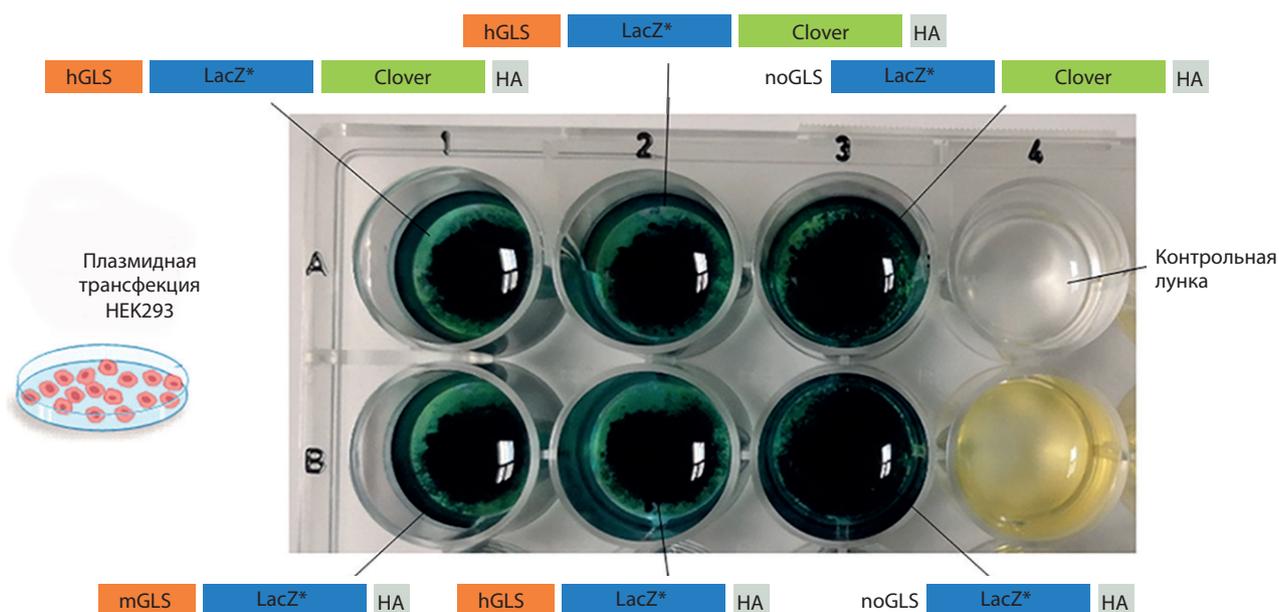


Рис. 4. Тестирование β-галактозидазной активности фермента LacZ* в клетках. Субстрат X-gal разлагается ферментами на галактозу и 5-бromo-4-хлоро-3-гидроксииндол. Последний димеризуется при окислении на воздухе с образованием нерастворимого вещества синего цвета. Клетки HEK293, экспрессирующие конструкции с LacZ*, инкубировали с X-gal. Контрольная лунка содержала клетки без трансфекции

Эффективность получения трансгенных животных методом пронуклеарной микроинъекции

Конструкция	Вымыто зигот	Подсажено зигот	Реципиентные самки (беременность)	Родилось (трансгенные)
Csn1s1-mGLS-LacZ*-HA	147	92	8 (4)	12 (4)
CAG-hGLS-LacZ*-Clover-HA	118	81	5 (2)	11 (4)

Перед получением трансгенных животных было необходимо предварительно оценить активность фермента LacZ* в клетках млекопитающих, поэтому мы использовали стандартное окрашивание с субстратом X-gal, который похож по структуре на лактозу и гидролизуется β-галактозидазами с образованием нерастворимого синего пигмента (рис. 4). Через 2 дня после трансфекции плазмидами клетки HEK293 фиксировали в параформальдегиде и инкубировали с X-gal 16 ч. Как видно на рис. 4, при использовании конструкций появился синий пигмент, что говорит о функциональной активности синтезированного гена LacZ* и его вариантов.

Чтобы оценить стабильность LacZ* в клетках млекопитающих, мы провели Вестерн блоттинг с антителами на HA-таг. Результаты подтверждают правильный синтез белка LacZ* и отсутствие деградации в клетках млекопитающих (рис. 5). Согласно белковому маркеру, бэнды LacZ* лежат в диапазоне 130–180 kDa, что соответствует теоретическому размеру белка (размер белка LacZ* : 1008 аминокислот = 121 kDa; размер самого большого варианта LacZ*+ mGLS + Clover + HA-таг: 166 kDa). Таким образом, наличие HA-тага на C-конце белка LacZ* позволит в дальнейшем детектировать его в тканях мышей.

Получение и анализ трансгенных линий мышей

Для получения трансгенных мышей нами было выбрано два варианта конструкций: Csn1s1-mGLS-LacZ*-HA и CAG-hGLS-LacZ*-Clover-HA (см. рис. 1, 2). В первом случае экспрессия гена обеспечивается «молочным» промотором и регуляторными элементами гена α-казеина (*Csn1s1*) козы и быка, чтобы локализовать активность LacZ* молочной железой в период лактации. Этот подход был описан в нашей лаборатории ранее (Serova et al., 2012; Burkov et al., 2013). Второй вариант трансгена содержит искусственный CAG-промотор, который должен обеспечивать высокую конститутивную экспрессию LacZ* во всех тканях.

Для пронуклеарных микроинъекций использовали лиnearизованные варианты плазмид (см. рис. 1, 2). Среднее число родившихся мышат (выживаемость) и доля трансгенных животных для двух линий составили 13 и 30–40 % соответственно (см. таблицу).

ПЦР-генотипирование с праймерами на ген LacZ* показало, что в первой линии с «молочным» промотором родилось 4 F0-фаундеров (рис. 6, а). Для второго варианта конструкции с промотором CAG было также обнаружено 4 трансгенных фаундера (см. рис. 6, б). Для того чтобы опреде-

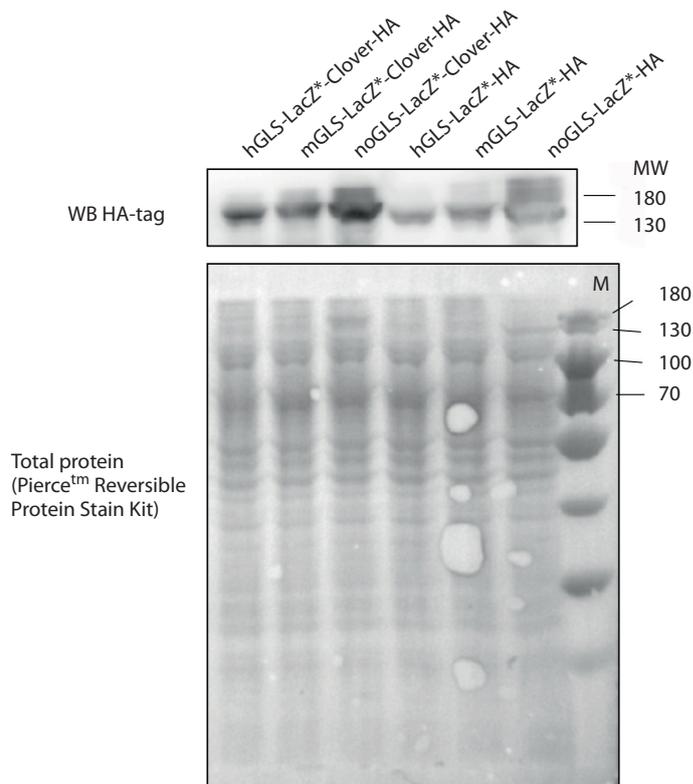


Рис. 5. Вестерн блоттинг с антителами на HA-таг для детекции LacZ*. Тотальный белок из трансфицированных плазмидами клеток разгонялся в денатурирующем 10 % полиакриламидном геле (SDS-PAGE). Внизу показана PVDF-мембрана после трансфера, обратимо окрашенная на тотальный белок. Вверху фрагмент этой мембраны после окрашивания антителами на HA-таг. MW – молекулярный вес белков в килодальтонах (kDa)

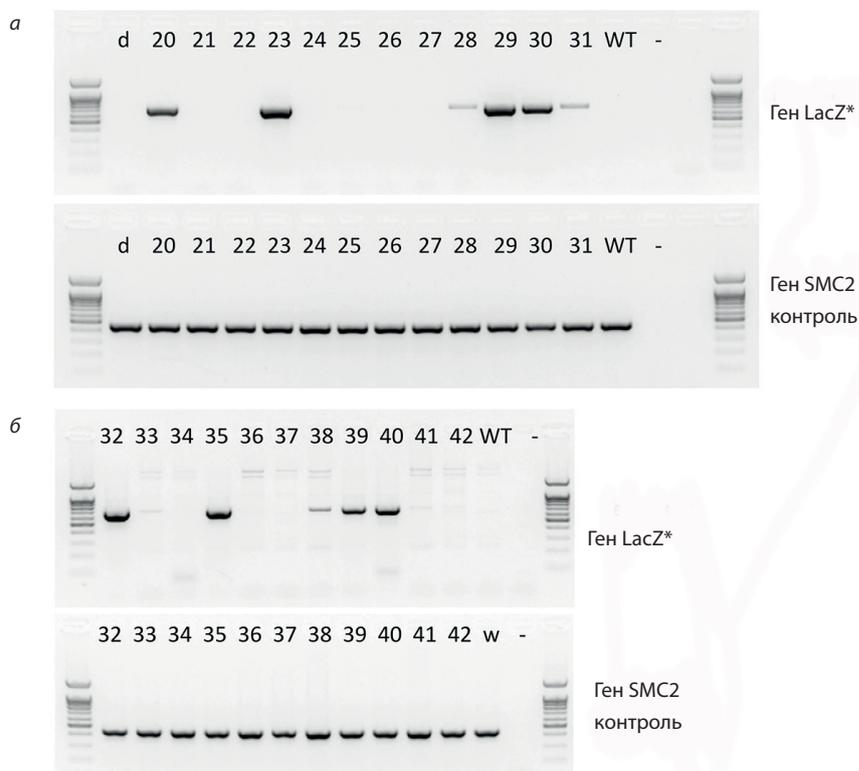


Рис. 6. Генотипирование трансгенных фаундеров: *a* – конструкция с промотором Csn1s1. d – мертворожденный потомок. #20–31 – номера мышей, WT – ДНК дикого типа, (-) – вода. Праймеры на ген LacZ* дают ПЦР-продукт размером 628 п.о. Праймеры на ген SMC2 мыши (контроль качества выделения ДНК) – 410 п.о.; *б* – конструкция с CAG-промотором

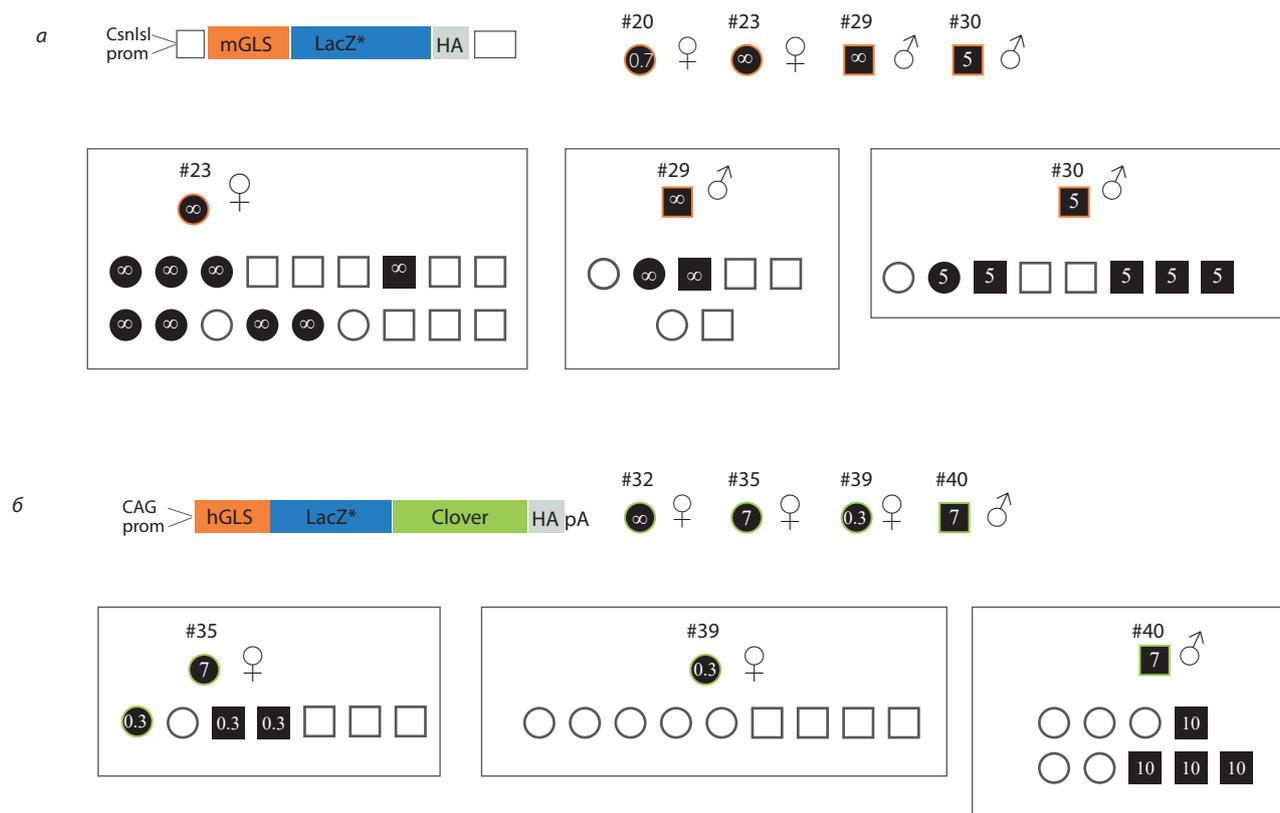


Рис. 7. Общая схема наследования трансгенов в шести линиях. Закрашенные фигуры символизируют трансгенных потомков. Для некоторых фаундеров было получено два помета, которые представлены двумя рядами фигур. Копийность определяли как для F0, так и для F1 животных. *а* – конструкция с промотором Csn1s1; *б* – конструкция с CAG-промотором

лечь примерное число копий трансгена, был проведен анализ копийности методом капельной цифровой ПЦР (ddPCR) (Smirnov et al., 2020) у животных F0 и в дальнейшем у их потомков. Анализ числа копий трансгена (рис. 4П) выявил, что все 8 фаундеров имеют различную копийность, от 0.3 копии трансгена до более чем 50 копий (рис. 7). Число копий ниже 1, как правило, говорит о том, что анализируемое животное является мозаиком, то есть состоит из смеси клеток дикого типа и содержащих трансген. Определение точного значения для многокопийных встроков представляет технические сложности в ddPCR, так как требует сильного разбавления ДНК и подбора условия для референсного гена *Emid1*. По этой причине мы не ставили себе целью точное определение копийности в многокопийных линиях. Для них копийность обозначена значком ∞ (> 50 копий). Как мы и ожидали, животные со слабыми бэндами (#28, 31, 33, 38) имели очень низкую копийность (< 0.01), поэтому не рассматривались для скрещиваний.

Для получения потомства F1 трансгенные фаундеры скрещивались с животными линии C57BL/6. Самка и самец F0 с молочным промотором #23 и 30 передавали трансген ~50 % потомков, что говорит о нормальном наследовании трансгена (рис. 7). В линии #29 размер двух пометов был меньше ожидаемого, это может служить индикато-

ром инсерционного мутагенеза в линии #29 и требует дополнительного изучения. Среди скрещиваний F0 с CAG-промотором ни одно не дало нормальных F1-самок для анализа экспрессии LacZ* в молочной железе. Так, F0 самка #35 не передавала трансген своим потомкам (в этой линии наблюдается слабый сигнал при ПЦР-генотипировании, но это может быть обломок трансгена); F0 самка #39 имела серьезный мозаицизм (только 0.3 копии трансгена) и также не передавала трансген потомкам; F0 самец #40 передавал трансген только самцам, что говорит об интеграции конструкции в Y-хромосому.

В настоящий момент ведутся скрещивания двух последних фаундеров (#20 и 32) для анализа наследования и экспрессии LacZ*.

Самки из линий #23, 30 и 35 были выбраны для анализа органов и сбора молока. Мы также собрали органы от самцов линии #40. Анализ экспрессии гена LacZ* методом ОТ-ПЦР показал невысокий уровень экспрессии LacZ* в молочной железе (рис. 8, а) и отсутствие экспрессии в органах одного из F1 самцов линии #40. (Это может быть вызвано интеграцией в транскрипционно неактивный сайт на Y-хромосоме.) Анализ тех же образцов кДНК капельной цифровой ПЦР (ddPCR) показал относительно низкий уровень экспрессии в молочной железе – примерно 0.01 % от

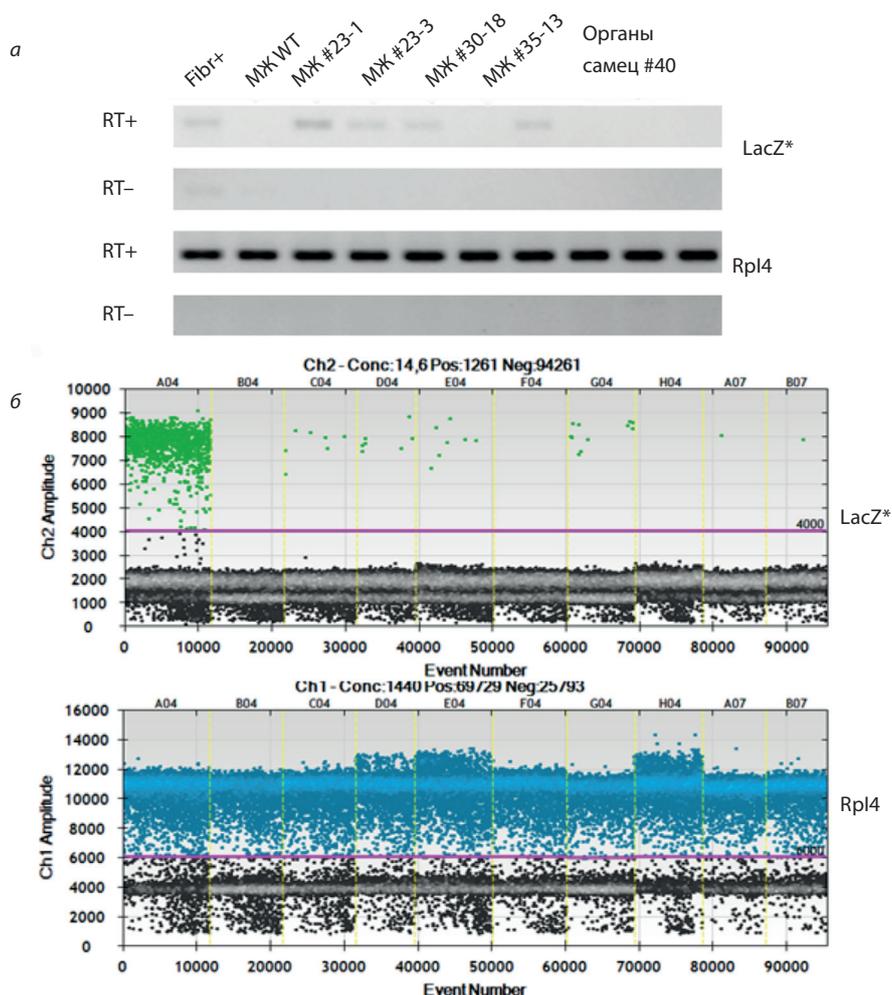


Рис. 8. Предварительный анализ экспрессии трансгена в тканях мышей: а – ОТ-ПЦР с праймерами на трансген и контрольный ген (Rpl4). Обозначения: Fibr+ – положительный контроль (трансфицированные плазмидой фибробласты мыши); МЖ – молочные железы из разных линий. Последние четыре образца – органы F₁ самца линии #40 (сердце, легкие, почка, селезенка). RT – контроль на контаминацию ДНК (обратная транскрипция без добавления фермента); б – капельная цифровая ПЦР для анализа экспрессии. Образцы кДНК были взяты в том же порядке, что и в ОТ-ПЦР

Rpl4 (см. рис. 8, б и 5П). Нами было также собрано молоко от трансгенных самок – #23, 30, 35 (рис. 6П). Оно может быть использовано для предварительного анализа эффекта LacZ на содержание лактозы и отработки методов изучения углеводного состава молока.

Обсуждение

В молочной промышленности используется большое количество бактериальных β-галактозидаз, многие из них запатентованы (Vera et al., 2016; Botvynko et al., 2019). Сейчас идет активный поиск новых ферментов, которые имели бы улучшенные характеристики и высокую трансгалактозилазную активность для получения ГОС (Liu et al., 2017; Kittibunchakul et al., 2019; Qin et al., 2019). Для нашего проекта мы остановили свой выбор на гене LacZ* из бактерии *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* DSM 20081 (Nguyen

et al., 2012). Эта бактерия метаболизирует лактозу в качестве единственного источника энергии, и фермент LacZ* имеет подходящие характеристики для экспрессии в молочной железе. Фермент, выбранный нами для проекта, имеет более высокую эффективность конверсии лактозы (30 % глюкозы, 12 % галактозы, 10 % лактозы, 48 % ГОС), чем более ранние аналоги (Vera et al., 2016).

Нам известны два исследования, в которых предпринята попытка создать животных с безлактозным молоком. В работе (Stinnakre et al., 1994) были получены мыши с нокаутом по гену α-лактальбумина (кофактора лактоз-синтазы β4Gal-T1), что привело к полному отсутствию лактозы в молоке. (Нокауты по гену самой лактоз-синтазы β4Gal-T1 сублетальны и вызывают раннюю смерть, так как, помимо синтеза лактозы, β4Gal-T1 участвует в N-гликозилировании белков (Asano et al., 1997).) Интересно, что, хотя основные компоненты моло-

ка не были затронуты, лактация практически прекратилась из-за высокой вязкости капель внутри клеток молочного эпителия (Stinnakre et al., 1994), вызванной нарушением осмотического баланса. Авторы второй работы учли эти данные, выбрав подход с оверэкспрессией гена лактазы крысы, который в норме активен в эпителии кишечника (Jost et al., 1999). Они создали линию мышей с экспрессией лактазы под промотором молочного гена и показали, что это снижает содержание лактазы в молоке на 50–85 %. Одной из обнаруженных ими проблем была реабсорбция глюкозы обратно в молочную железу, поэтому углеводный состав полученного молока был хуже ожидаемого. Плотность молока также отличалась от нормальной (Jost et al., 1999).

Таким образом, несбалансированное снижение концентрации лактозы в молоке приводит к повышению вязкости и уменьшению объема молока, а также к ухудшению его пищевой ценности. Эта проблема пока не решена, поэтому успешных глобальных проектов по созданию «безлактозных» животных еще нет. На наш взгляд, оптимальный подход по созданию безлактозного молока заключается в модификации лактоз-синтазы $\beta 4Gal-T1$ для того, чтобы она создавала альтернативные сахара (Ramakrishnan, Qasba, 2002). В этом случае можно будет соединить нокаут по гену α -лактальбумина и встройку модифицированной $\beta 4Gal-T1$ в геном. К сожалению, исследования по молекулярному моделированию субстрат-специфичности лактазы $\beta 4Gal-T1$ пока еще только начинаются (Qasba et al., 2008; MacArthur, Chen, 2016).

Эксперименты по модификациям состава молока можно проводить на специальных культурах клеток молочной железы (Tsugami et al., 2020) или на органоидах молочной железы (Sumbal et al., 2020). Исходя из нашего опыта создание трансгенных мышей и анализ лактации с отработанным протоколом занимает не так много времени, но гораздо информативней. В ходе работы мы планировали предварительно протестировать различные аспекты этого подхода, включая и два варианта дизайна трансгена.

Во-первых, мы хотели сравнить альтернативные промоторы: *Csn1s1* и *CAG*. Конструкция с «молочным» промотором *Csn1s1*, изученным ранее в нашей лаборатории (Serova et al., 2012; Burkov et al., 2013), включает в себя промотор гена альфа-S1-казеина козы (*Csn1s1*), и нетранслируемые регуляторные элементы (UTR), фланкирующие трансген: интрон 1 от *Csn1s1* козы и интрон 18 от *Csn1s1* быка (розовые прямоугольники на рис. 1, з). Промотор должен обеспечивать экспрессию *LacZ** строго во время лактации в молочной железе, однако его экспрессия может быть не такой высокой, как у промотора *CAG*. Промотор *CAG* является сильным промотором (Chen et al., 2011) и должен гарантировать высокий уровень экспрессии трансгена, но в то же время повсеместная экспрессия фермента *LacZ** может быть токсичной для организма. Ген *LacZ* *E. coli* часто используется в биологии для получения трансгенных животных и не обладает токсичностью, но выбранный нами вариант *LacZ** не гомологичен классическому *LacZ*, имеет дополнительные каталитические домены и ранее не тестировался на мышах. К сожалению, в нашем случае трансгенные линии с *CAG* не передавали трансген самкам, из-за чего анализ молока ока-

зался невозможным. Единственная линия, в которой определялась передача трансгена потомкам (#40), не показала экспрессии в органах самца (см. рис. 8), вероятно, в связи с интеграцией трансгена в Y-хромосому.

Во-вторых, мы планировали сравнить два сигнала локализации – hGLS и mGLS. Оба сигнала локализации показывали схожий паттерн локализации в клетках человека HEK293 и фибробластах мыши (см. рис. 2). Мы решили выбрать оба варианта, так как гистохимический анализ молочных желез с антителами на HA-таг (см. рис. 3) и различные компартменты (цис- и транс-отдел АГ, ЭПР) поможет более точно выявить эффективность локализации в АГ для двух вариантов GLS. Для дальнейших экспериментов будет интересно сравнить и то, как отсутствие GLS скажется на активности *LacZ**, – вариант noGLS (см. рис. 1, в).

Наконец, при дизайне конструкций *LacZ** мы запланировали возможность удаления из плазмид гена *Clover* (см. рис. 1, в), так как его присутствие может влиять на каталитическую активность *LacZ**. Однако также известны случаи, когда наличие дополнительных доменов помогает увеличивать стабильность и экспрессию чужеродного белка за счет улучшения фолдинга. Данные Вестерн блота (см. рис. 5), на которых видно, что укороченные версии конструкций *LacZ** дают более слабый сигнал, также могут указывать на стабилизирующую роль *Clover* в составе *LacZ**.

Анализ перечисленных параметров трансгенных линий поможет отработать методику для получения более сложных вариантов модификаций молока. К примеру, в настоящий момент мы рассматриваем альтернативный подход, который заключается в замене активности собственной лактоз-синтазы $\beta 4Gal-T1$ мыши на другой фермент из класса гликозилтрансфераз, который бы синтезировал дисахарид трегалозу, наиболее близкий лактозе по свойствам углеводов (Elbein et al., 2003). Трегалоза распространена в природе, ее синтез описан у дрожжей, членистоногих и грибов, но отсутствует у позвоночных (Argüelles, 2014; Hibshman et al., 2017). Мы проанализировали возможность замены $\beta 4Gal-T1$ мыши на трегалоз-синтазу из других организмов, например *E. coli* (Guo et al., 2000), нематоды (Hibshman et al., 2017) или грибов-базидиомицетов (Saito et al., 1998). Возможность биосинтеза трегалозы была ранее показана в клетках млекопитающих (Guo et al., 2000), но возникает много вопросов, связанных с компартиментализацией в клетках молочной железы, так как синтез молока идет внутри аппарата Гольджи, в то время как необходимые для синтеза трегалозы компоненты (трегалоз-6-фосфат или α -D-глюкоз-1-фосфат) находятся в цитоплазме. Совместив синтез трегалозы в молоке с нокаутом по гену лактальбумина, можно было бы повлиять на состав молока, заменив лактозу на трегалозу и сохранив основные свойства молока.

Заключение

Мышиные трансгенные модели удобно использовать как тест-систему для проверки различных β -галактозидаз или других ферментов для синтеза широкого спектра галактоолигосахаридов. Мышиное молоко похоже по содержанию лактозы на молоко сельскохозяйственных животных (2–5 %

веса), поэтому выбранные ферменты можно будет применять и для генетических модификаций в сельском хозяйстве.

С практической точки зрения выбор оптимальных сигналов локализации и промоторов будет важен для дальнейших биоинженерных работ по изменению свойств молока. Молоко, в котором лактоза заменена на альтернативный сахар (в нашем случае ГОС), сочетает в себе сразу несколько востребованных качеств: отсутствие лактозы и необычный вкус, а также не требует дополнительной переработки. По этой причине проекты, направленные на поиск генетических путей для модификации лактозного синтеза, очень актуальны, так как в случае функциональности такого подхода можно будет использовать целый спектр доступных гликозилтрансфераз (McArthur, Chen, 2016) для синтеза новых вариантов сахаров непосредственно в молочной железе.

Список литературы / References

- Argüelles J.C. Why can't vertebrates synthesize trehalose? *J. Mol. Evol.* 2014;79(3-4):111-116. DOI 10.1007/s00239-014-9645-9.
- Arribas J.C., Herrero A.G., Martín-Lomas M., Cañada F.J., He S., Withers S.G. Differential mechanism-based labeling and unequivocal activity assignment of the two active sites of intestinal lactase/phlorizin hydrolase. *Eur. J. Biochem.* 2000;267(24):6996-7005. DOI 10.1046/j.1432-1327.2000.01784.x.
- Asano M., Furukawa K., Kido M., Matsumoto S., Umesaki Y., Kochibe N., Iwakura Y. Growth retardation and early death of beta-1,4-galactosyltransferase knockout mice with augmented proliferation and abnormal differentiation of epithelial cells. *EMBO J.* 1997;16(8):1850-1857. DOI 10.1093/emboj/16.8.1850.
- Botvynko A., Bednářová A., Henke S., Shakhno N., Čurda L. Production of galactooligosaccharides using various combinations of the commercial β -galactosidases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019;517(4):762-766. DOI 10.1016/j.bbrc.2019.08.001.
- Burkov I.A., Serova I.A., Battulin N.R., Smirnov A.V., Babkin I.V., Andreeva L.E., Dvoryanchikov G.A., Serov O.L. Expression of the human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) gene under control of the 5'-regulatory sequence of the goat alpha-S1-casein gene with and without a MAR element in transgenic mice. *Transgenic Res.* 2013;22(5):949-964. DOI 10.1007/s11248-013-9697-4.
- Chen C.M., Krohn J., Bhattacharya S., Davies B. A comparison of exogenous promoter activity at the ROSA26 locus using a Φ C31 integrase mediated cassette exchange approach in mouse ES cells. *PLoS One.* 2011;6(8):e23376. DOI 10.1371/journal.pone.0023376.
- Cooper C.A., Maga E.A., Murray J.D. Production of human lactoferrin and lysozyme in the milk of transgenic dairy animals: past, present, and future. *Transgenic Res.* 2015;24(4):605-614. DOI 10.1007/s11248-015-9885-5.
- Elbein A.D., Pan Y.T., Pastuszak I., Carroll D. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology.* 2003;13(4):17R-27R. DOI 10.1093/glycob/cwg047.
- Fang L., Ahn J.K., Wodziak D., Sibley E. The human lactase persistence-associated SNP -13910*T enables in vivo functional persistence of lactase promoter-reporter transgene expression. *Hum. Genet.* 2012;131(7):1153-1159. DOI 10.1007/s00439-012-1140-z.
- Fassio F., Facioni M.S., Guagnini F. Lactose maldigestion, malabsorption, and intolerance: a comprehensive review with a focus on current management and future perspectives. *Nutrients.* 2018;10(11):1599. DOI 10.3390/nu10111599.
- Gabius H.J. The sugar code: Why glycans are so important. *Biosystems.* 2018;164:102-111. DOI 10.1016/j.biosystems.2017.07.003.
- Goedhart J., von Stetten D., Noirclerc-Savoye M., Lelimosin M., Joosen L., Hink M.A., van Weeren L., Gadella T.W. Jr., Royant A. Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%. *Nat. Commun.* 2012;3:751. DOI 10.1038/ncomms1738.
- Gulati K., Poluri K.M. Mechanistic and therapeutic overview of glycosaminoglycans: the unsung heroes of biomolecular signaling. *Glycoconj J.* 2016;33(1):1-17. DOI 10.1007/s10719-015-9642-2.
- Guo N., Puhlev I., Brown D.R., Mansbridge J., Levine F. Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells. *Nat. Biotechnol.* 2000;18(2):168-171. DOI 10.1038/72616.
- Gurtan A.M., Lu V., Bhutkar A., Sharp P.A. In vivo structure-function analysis of human Dicer reveals directional processing of precursor miRNAs. *RNA.* 2012;18(6):1116-1122. DOI 10.1261/rna.032680.112.
- Hibshman J.D., Doan A.E., Moore B.T., Kaplan R.E., Hung A., Webster A.K., Bhatt D.P., Chitrakar R., Hirschey M.D., Baugh L.R. daf-16/FoxO promotes gluconeogenesis and trehalose synthesis during starvation to support survival. *Elife.* 2017;6:e30057. DOI 10.7554/eLife.30057.
- Ingram C.J., Mulcare C.A., Itan Y., Thomas M.G., Swallow D.M. Lactose digestion and the evolutionary genetics of lactase persistence. *Hum. Genet.* 2009;124(6):579-591. DOI 10.1007/s00439-008-0593-6.
- Jost B., Vilotte J.L., Duluc I., Rodeau J.L., Freund J.N. Production of low-lactose milk by ectopic expression of intestinal lactase in the mouse mammary gland. *Nat. Biotechnol.* 1999;17(2):160-164. DOI 10.1038/6158.
- Kalds P., Zhou S., Cai B., Liu J., Wang Y., Petersen B., Sonstegard T., Wang X., Chen Y. Sheep and Goat Genome Engineering: From Random Transgenesis to the CRISPR Era. *Front Genet.* 2019;10:750. DOI 10.3389/fgene.2019.00750.
- Kittibunchakul S., Pham M.L., Tran A.M., Nguyen T.H. β -Galactosidase from *Lactobacillus helveticus* DSM 20075: biochemical characterization and recombinant expression for applications in dairy industry. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(4):947. DOI 10.3390/ijms20040947.
- Laible G., Smolenski G., Wheeler T., Brophy B. Increased gene dosage for β - and κ -casein in transgenic cattle improves milk composition through complex effects. *Sci. Rep.* 2016;6:37607. DOI 10.1038/srep37607.
- Liu Y., Chen Z., Jiang Z., Yan Q., Yang S. Biochemical characterization of a novel β -galactosidase from *Paenibacillus barengoltzii* suitable for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. *Int. J. Biol. Macromol.* 2017;104(Pt A):1055-1063. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2017.06.073.
- McArthur J.B., Chen X. Glycosyltransferase engineering for carbohydrate synthesis. *Biochem. Soc. Trans.* 2016;44(1):129-142. DOI 10.1042/BST20150200.
- Mihov D., Spiess M. Glycosaminoglycans: Sorting determinants in intracellular protein traffic. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2015;68:87-91. DOI 10.1016/j.jbiocel.2015.08.019.
- Neville M.C. Introduction: alpha-lactalbumin, a multifunctional protein that specifies lactose synthesis in the Golgi. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 2009;14(3):211-212. DOI 10.1007/s10911-009-9149-1.
- Nguyen T.T., Nguyen H.A., Arreola S.M., Mlynek G., Djinović-Carugo K., Mathiesen G., Nguyen T.H., Haltrich D. Homodimeric β -galactosidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081: expression in *Lactobacillus plantarum* and biochemical characterization. *J. Agric. Food Chem.* 2012;60(7):1713-1721. DOI 10.1021/jf203909e.
- Qasba P.K., Ramakrishnan B., Boeggeman E. Structure and function of beta-1,4-galactosyltransferase. *Curr. Drug Targets.* 2008;9(4):292-309. DOI 10.2174/138945008783954943.
- Qin Z., Li S., Huang X., Kong W., Yang X., Zhang S., Cao L., Liu Y. Improving galactooligosaccharide synthesis efficiency of β -galactosidase bgal1-3 by reshaping the active site with an intelligent hydrophobic amino acid scanning. *J. Agric. Food Chem.* 2019;67(40):11158-11166. DOI 10.1021/acs.jafc.9b04774.
- Ramakrishnan B., Qasba P.K. Structure-based design of beta 1,4-galactosyltransferase I (beta 4Gal-T1) with equally efficient N-acetylgalactosaminyltransferase activity: point mutation broadens beta 4Gal-T1 donor specificity. *J. Biol. Chem.* 2002;277(23):20833-20839. DOI 10.1074/jbc.M111183200.
- Saito K., Yamazaki H., Ohnishi Y., Fujimoto S., Takahashi E., Horinouchi S. Production of trehalose synthase from a basidiomycete, *Grifola frondosa*, in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1998;50(2):193-198. DOI 10.1007/s002530051276.
- Saqib S., Akram A., Halim S.A., Tassaduq R. Sources of β -galactosidase and its applications in food industry. *3 Biotech.* 2017;7(1):79. DOI 10.1007/s13205-017-0645-5.
- Ségurel L., Bon C. On the Evolution of Lactase Persistence in Humans. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2017;18:297-319. DOI 10.1146/annurev-genom-091416-035340.
- Serova I.A., Dvoryanchikov G.A., Andreeva L.E., Burkov I.A., Dias L.P., Battulin N.R., Smirnov A.V., Serov O.L. A 3,387 bp 5'-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. *Transgenic Res.* 2012;21(3):485-498. DOI 10.1007/s11248-011-9547-1.
- Shepelev M.V., Kalinichenko S.V., Deykin A.V., Korobko I.V. Production of Recombinant Proteins in the Milk of Transgenic Animals: Current State and Prospects. *Acta Naturae.* 2018;10(3):40-47.
- Smirnov A., Fishman V., Yunusova A., Korablev A., Serova I., Skryabin B.V., Rozhdestvensky T.S., Battulin N. DNA barcoding reveals that injected transgenes are predominantly processed by homologous recombination in mouse zygote. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(2):719-735. DOI 10.1093/nar/gkz1085.
- Stinnakre M.G., Vilotte J.L., Soulier S., Mercier J.C. Creation and phenotypic analysis of alpha-lactalbumin-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994;91(14):6544-6548. DOI 10.1073/pnas.91.14.6544.
- Sumbal J., Chiche A., Charifou E., Koledova Z., Li H. Primary mammary organoid model of lactation and involution. *Front. Cell Dev. Biol.* 2020;8:68. DOI 10.3389/fcell.2020.00068.
- Tannous A., Pisoni G.B., Hebert D.N., Molinari M. N-linked sugar-regulated protein folding and quality control in the ER. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2015;41:79-89. DOI 10.1016/j.semcdb.2014.12.001.
- Tsugami Y., Suzuki N., Kawahara M., Suzuki T., Nishimura T., Kobayashi K. Establishment of an in vitro culture model to study milk production and the blood-milk barrier with bovine mammary epithelial cells. *Anim. Sci. J.* 2020;91(1):e13355. DOI 10.1111/asj.13355.
- Vera C., Córdova A., Aburto C., Guerrero C., Suárez S., Illanes A. Synthesis and purification of galacto-oligosaccharides: state of the art. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2016;32(12):197. DOI 10.1007/s11274-016-2159-4.
- Wang Y., Sheng Z., Wang Y., Li Q., Gao Y., Wang Y., Dai Y., Liu G., Zhao Y., Li N. Transgenic mouse milk expressing human bile salt-stimulated lipase improves the survival and growth status of premature mice. *Mol. Biotechnol.* 2015;57(3):287-297. DOI 10.1007/s12033-014-9822-5.
- Xiao Y., Chen Q., Guang C., Zhang W., Mu W. An overview on biological production of functional lactose derivatives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019;103(9):3683-3691. DOI 10.1007/s00253-019-09755-6.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 03.11.2021. После доработки 19.11.2021. Принята к публикации 22.11.2021.

Приложение

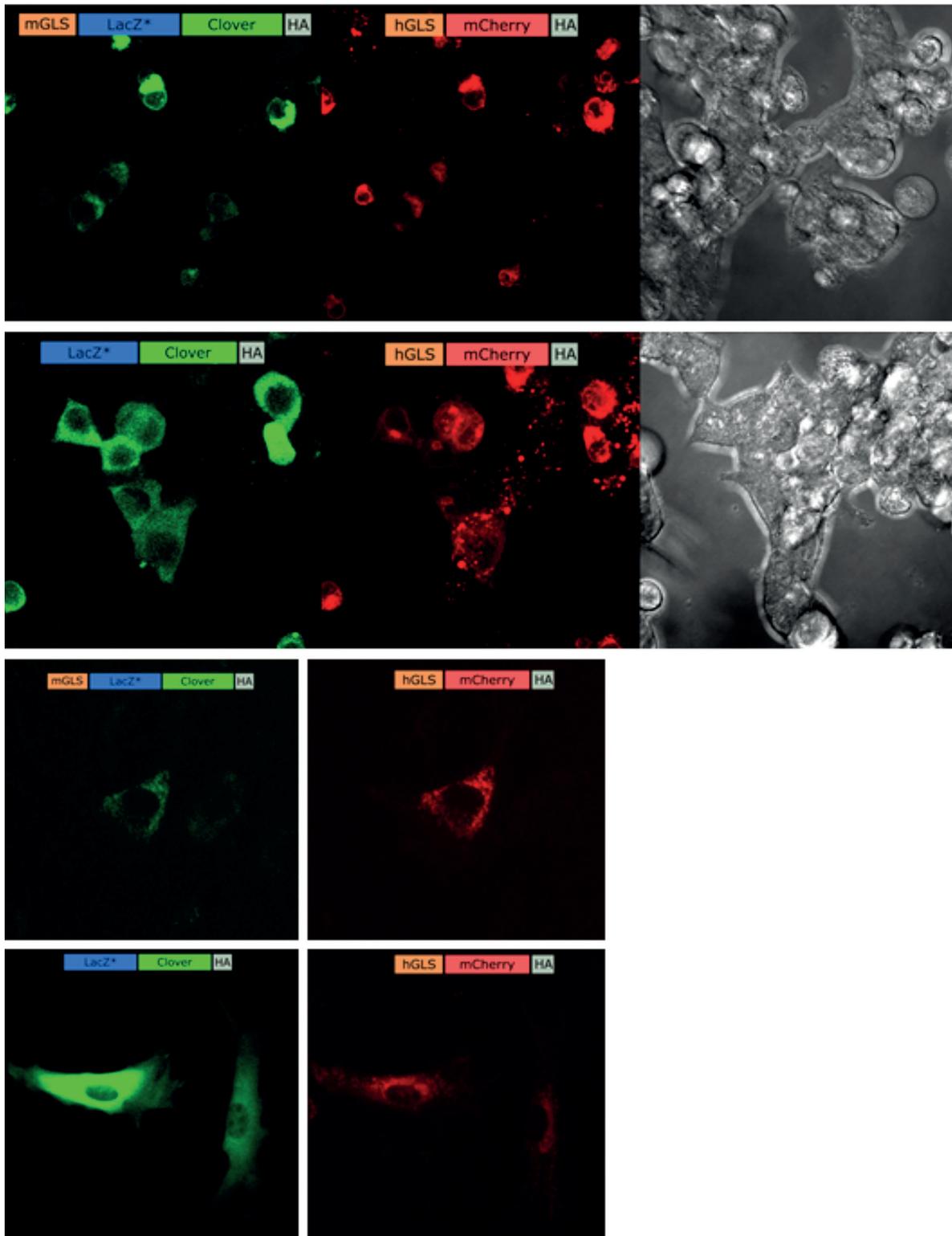
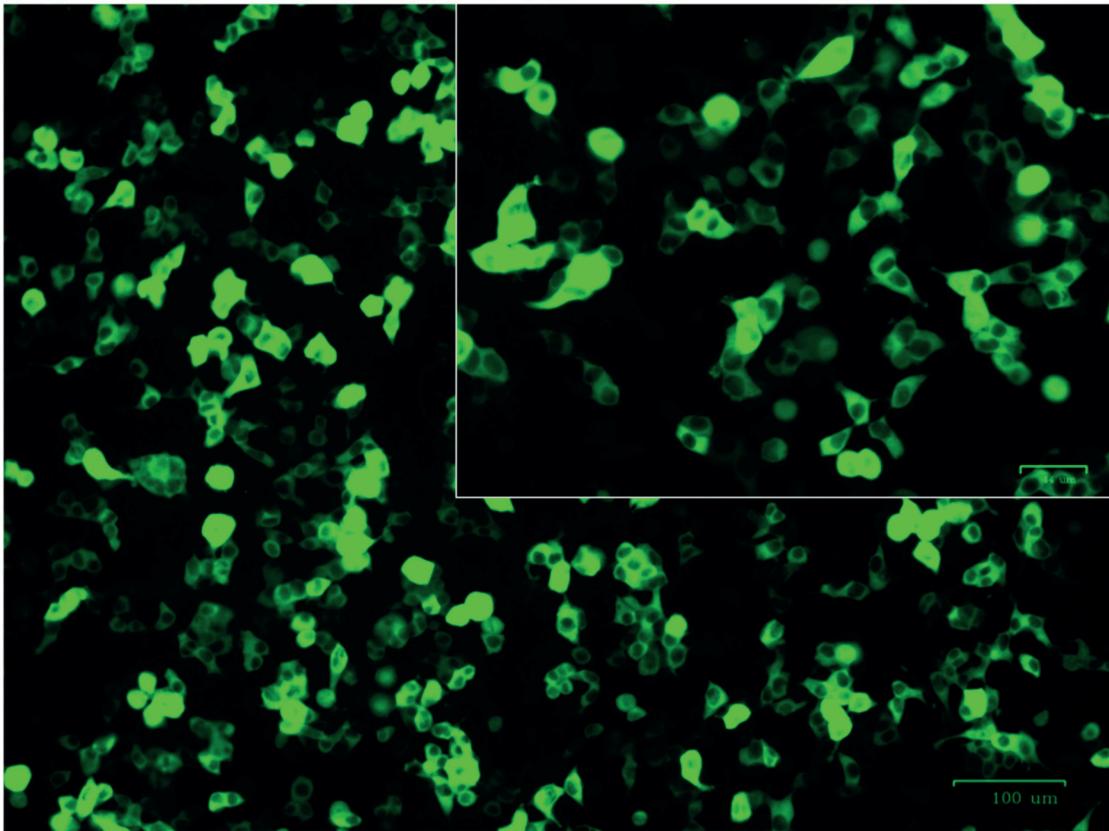


Рис. 1П. Флуоресцентный анализ клеток HEK293 (а) и первичных фибробластов мыши (б), трансфицированных плазмидами mGLS-LacZ*-Clover-HA или noGLS-LacZ*-Clover-HA. Контрольная плазмида – hGLS-mCherry-HA

Плазмидная трансфекция HEK293: LacZ-Clover без сигнала локализации



Плазмидная трансфекция HEK293: LacZ*-Clover с hGLS

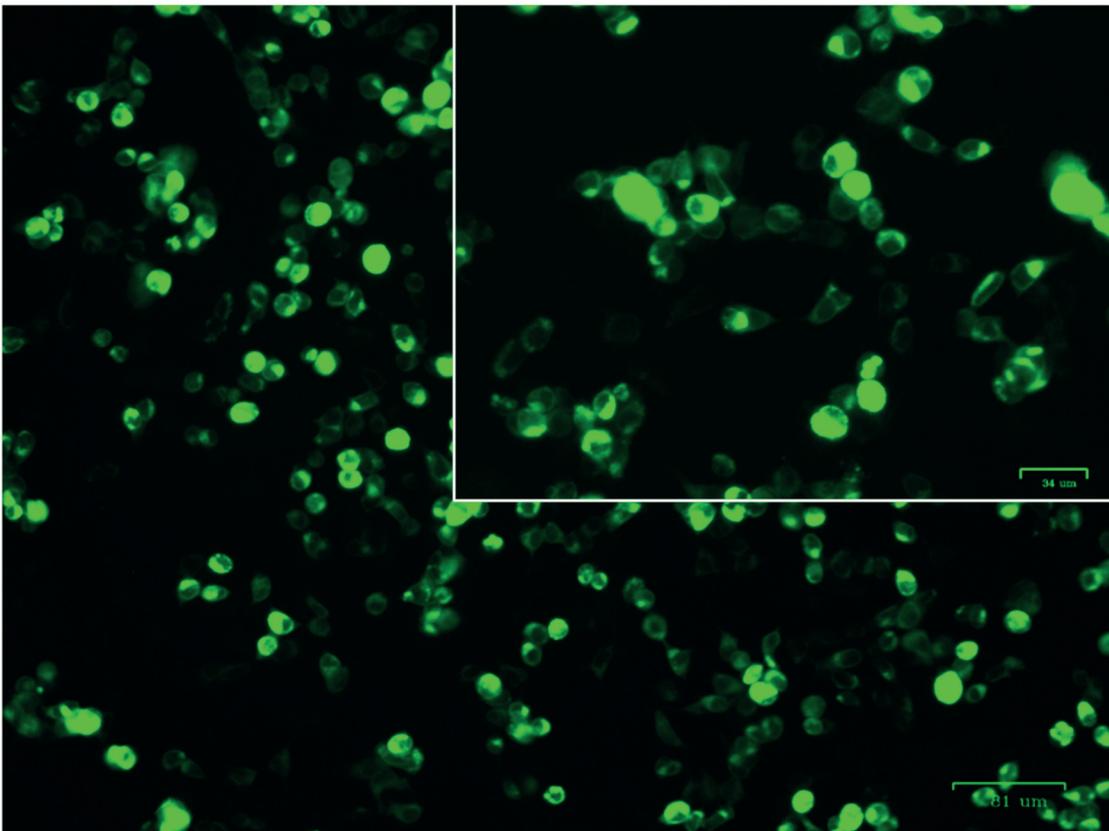


Рис. 2П. Общий вид популяции клеток HEK293 после трансфекции плазмидами LacZ с сигналом локализации или без него

Плазмидная трансфекция фибробластов

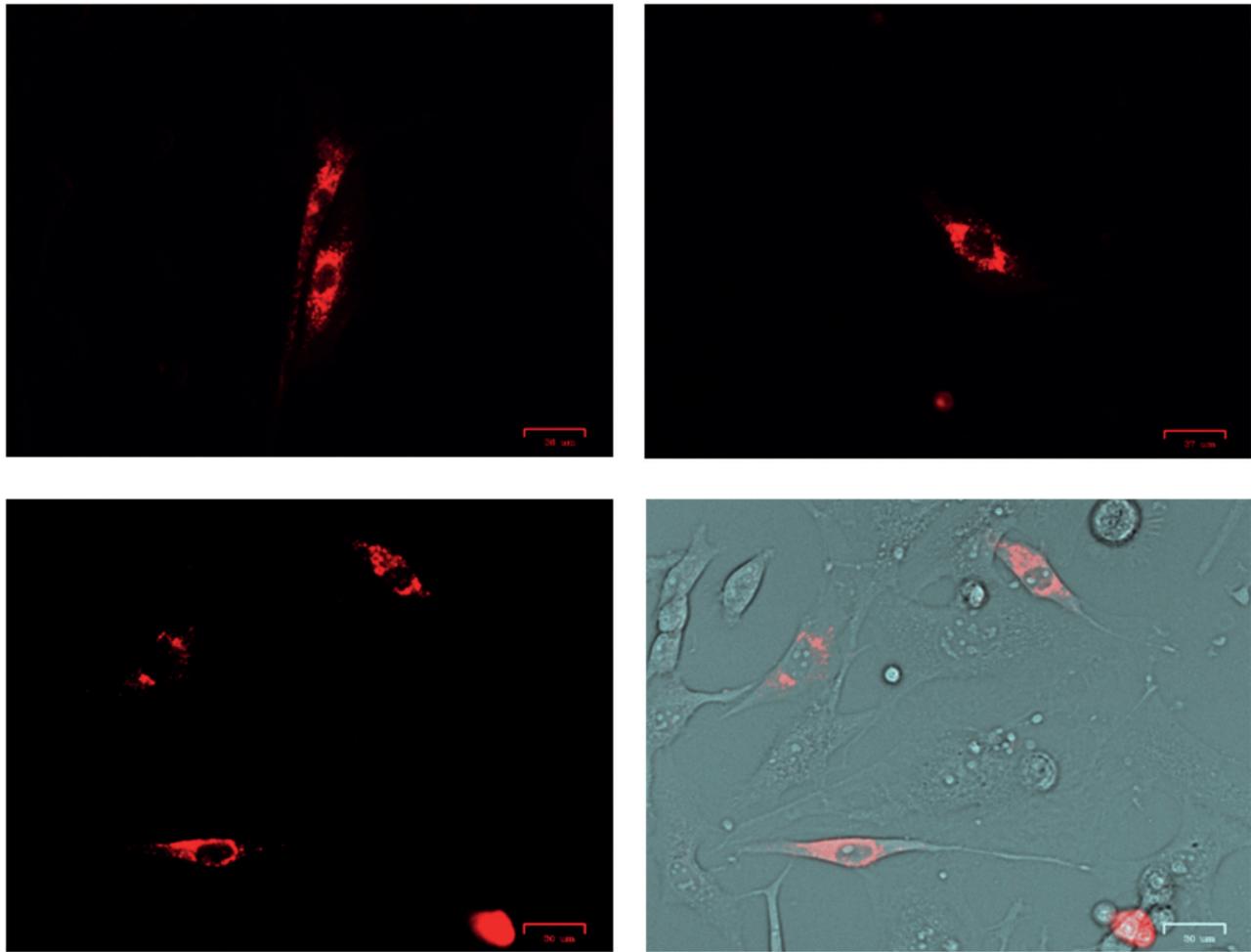


Рис. 3П. Первичные фибробласты мыши после трансфекции плазмидой mCherry с сигналом локализации hGLS

Температура отжига 68 >>> 50 °C

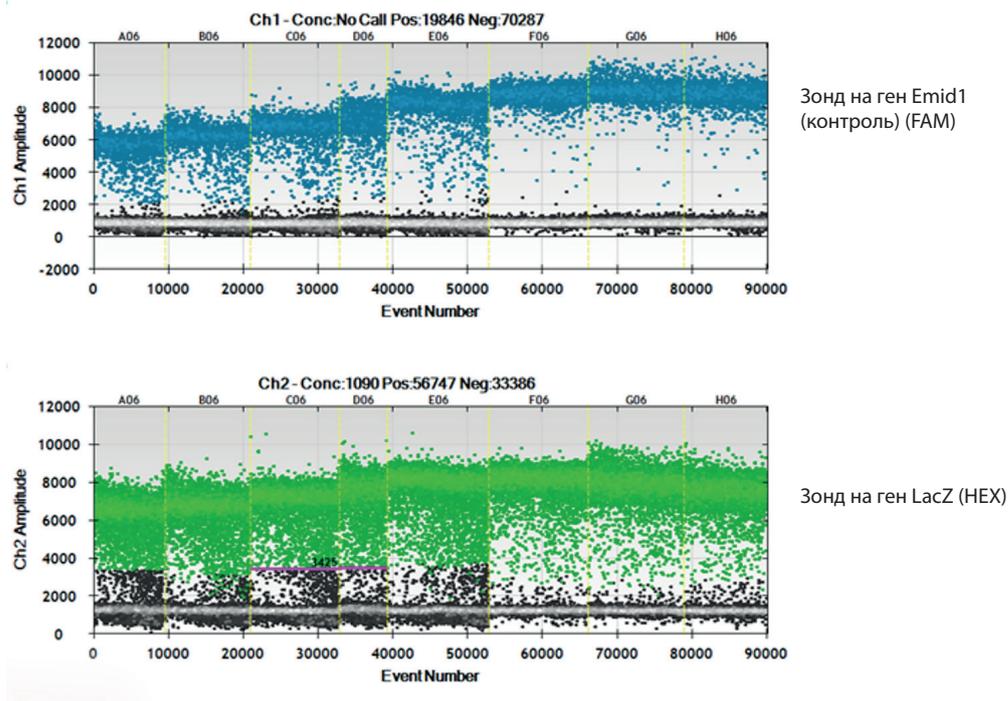


Рис. 4П. Градиент для капельной цифровой ПЦР для анализа копийности в линии мышей с числом копий = 5

Температура отжига 68 >>> 50 °C

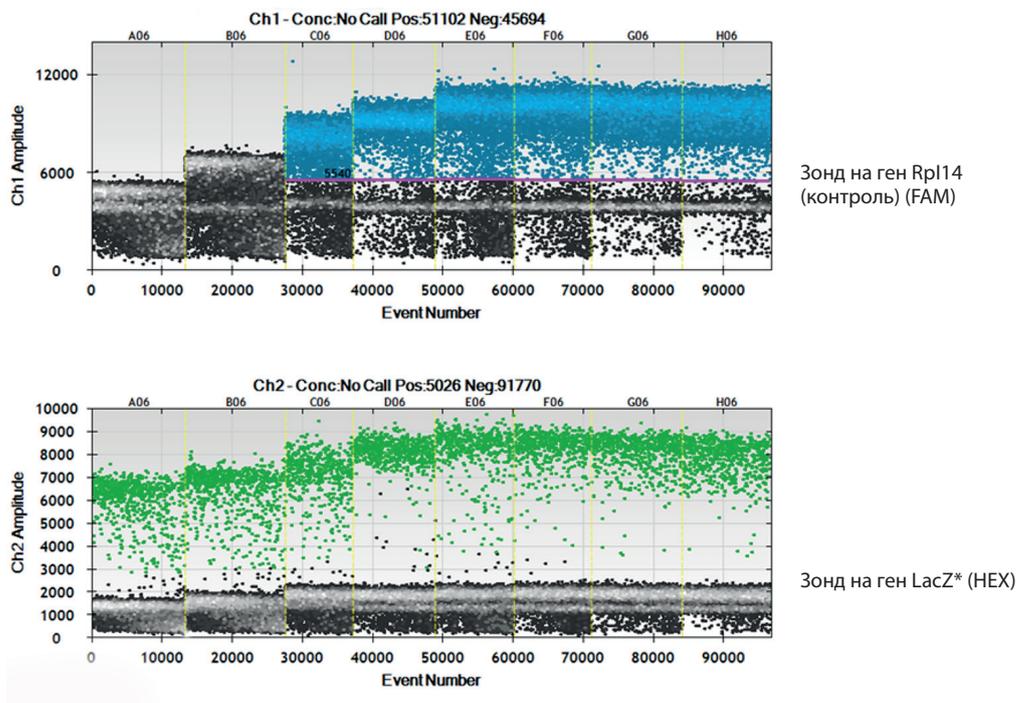


Рис. 5П. Градиент для капельной цифровой ПЦР для анализа экспрессии гена LacZ*. кДНК получена из фибробластов мыши, трансфицированных плазмидой hGLS-LacZ-Clover-NA



Рис. 6П. Молоко, собранное от трансгенных самок линий #23, 30, 35

 pismavavilov.ru

DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-24

Оригинальное исследование

Клонирование и экспрессия гена целлюлазы *Penicillium* sp. 'occitanis' в *Komagataella phaffii* T07, выделение и анализ свойств

А.С. Розанов^{1,2}, М.Е. Воскобоев^{1,2}, Н.В. Богачева^{1,2}, А.В. Коржук^{1,2}, В.Н. Шляхтун^{1,2}, И.А. Мещерякова^{1,2}, В.А. Романцев³, Д.В. Бочков¹, А.В. Задорожный^{1,2}, С.Е. Пельтек^{1,2}

Аннотация: Проведены клонирование и анализ свойств целлюлазы *Penicillium* sp. 'occitanis'. Ген был обнаружен в геномных данных базы NCBI. Получена плаزمида pPZL-4xBGLU-Росс, несущая четыре копии конструкции, экспрессирующей ген целлюлазы *P. sp. 'occitanis'*. Плазмида была клонирована в штамм дрожжей *Komagataella phaffii* T07 под контроль промотора и терминатора гена *AOX1*. Было клонировано четыре копии экспрессирующей конструкции. В результате получен штамм *K. phaffii* T07 BGLU-4xРосс. Максимальный уровень экспрессии этого штамма составил ~4 000 000 Ед/л культуральной жидкости при культивировании в 5-литровом биореакторе. Полученный белок, согласно данным гель-электрофореза, дает полосу ~39.5 кДа, что соответствует расчетной массе, и обширную область примерно от 42 до 70 кДа. Формирование этой области говорит о возможном гликозилировании белка при экспрессии в *K. phaffii*. Анализ свойств фермента показал, что температурный оптимум активности составляет 55–65 °С, рН оптимум – примерно 1.5–2. Фермент сохраняет 50 % активности при рН от 1.5 до 6 и от 30 до 80 °С. Он стабилен при температуре ниже 75 °С в течение 4 ч, но при 85 °С за 4 ч теряет 50 % активности. Фермент устойчив при рН от 4 до 7.5.

Ключевые слова: целлюлаза; карбогидраза; эндо- β -1,4-глюканаза (ЕС 3.2.1.4); *Penicillium* sp. 'occitanis'; *Pichia pastoris*; *Komagataella phaffii*; биотехнология; культивирование.

Благодарности: Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках реализации комплексного проекта по созданию высокотехнологичного производства по теме: «Создание высокотехнологичного производства высококачественных растительных пищевых белков» (Соглашение о предоставлении из федерального бюджета субсидии на развитие кооперации государственного научного учреждения и организации реального сектора экономики в целях реализации комплексного проекта по созданию высокотехнологичного производства № 075-11-2020-036 от 15.12.2020) в рамках Постановления Правительства РФ от 9 апреля 2010 г. № 218 на базе ИЦиГ СО РАН. Авторы выражают благодарность ЦКП протеомного и метаболомного профилирования микроорганизмов, финансируемому из средств проекта № 0259-2021-0010.

Для цитирования: Розанов А.С., Воскобоев М.Е., Богачева Н.В., Коржук А.В., Шляхтун В.Н., Мещерякова И.А., Романцев В.А., Бочков Д.В., Задорожный А.В., Пельтек С.Е. Клонирование и экспрессия гена целлюлазы *Penicillium* sp. 'occitanis' в *Komagataella phaffii* T07, выделение и анализ свойств. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;7(4):194-200. DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-24

Original article

Cloning and expression of a cellulase gene from *Penicillium* sp. 'occitanis' in *Komagataella phaffii* T07

A.S. Rozanov^{1,2}, M.E. Voskoboev^{1,2}, N.V. Bogacheva^{1,2}, A.V. Korzhuk^{1,2}, V.N. Shlyahtun^{1,2}, I.A. Mescheryakova^{1,2}, V.A. Romancev³, D.V. Bochkov¹, A.V. Zadorozhnyy^{1,2}, S.E. Peltek^{1,2}

Abstract: In this study we cloned a cellulase from *Penicillium* sp. 'occitanis' and analyzed its properties. The gene was extracted from the NCBI database. We constructed a pPZL-4xBGLU-Pocc plasmid carrying four copies of a construction capable of expressing the *P. sp. 'occitanis'* cellulase. The plasmid was inserted into the *Komagataella phaffii* T07 yeast strain under the control of *AOX1* promoter and terminator. A total of four copies of the expressed construction was cloned. As the result, we obtained the *K. phaffii* T07 BGLU-4xPocc

¹ Курчатовский геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия
Kurchatov Genomic Center of ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Лаборатория молекулярных биотехнологий ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия
Laboratory of Molecular Biotechnologies of ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Акционерное общество «Эфирное», г. Алексеевка, Белгородская область, Россия
Efirnoe Joint-Stock Company, Alekseevka, Belgorod region, Russia

 rozanov@bionet.nsc.ru

© Розанов А.С., Воскобоев М.Е., Богачева Н.В., Коржук А.В., Шляхтун В.Н., Мещерякова И.А., Романцев В.А., Бочков Д.В., Задорожный А.В., Пельтек С.Е., 2021

strain. The maximum expression level of the strain was ~4 000 000 U per 1 l of culture media in a 5 l bioreactor. The obtained protein was seen as a ~39.5 kDa band on the gel, which accords with its calculated mass. It also formed a smear from about 42 to 70 kDa, which probably indicates its glycosylation during the expression in *K. phaffii*. The temperature optimum of the enzyme was at 55–65 °C, and pH at ~1.5–2. The enzyme retains at least 50 % activity at pH ranging from 1.5 to 6, and at 30 to 80 °C. Below 75 °C, the protein remains active for 4 h. At 85 °C, it loses 50 % of its activity after 4 h. The enzyme is stable in pH ranging from 4 to 7.5.

Key words: cellulase; carbohydrase; endo- β -1,4-glucanase (EC 3.2.1.4); *Penicillium* sp. 'occitanis'; *Pichia pastoris*; *Komagataella phaffii*; biotechnology; cultivation.

Acknowledgements: The study was funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation as a part of the comprehensive project on high-tech industry "Creation of high-tech production of high-quality plant food proteins" (The agreement on the provision of subsidies from the federal budget for the development of cooperation of a state scientific institution and organization the real sector of the economy in order to implement a comprehensive project for the creation of high-tech industry No. 075-11-2020-036 from 15.12.2020) in the framework of the Decree of the Government of the Russian Federation of April 9, 2010 No. 218 on the basis of the ICG SB RAS. We thank ICG SB RAS Core Facility of Proteomic and metabolomic profiling of microorganisms (supported by project No. 0259-2021-0010).

For citation: Rozanov A.S., Voskoboev M.E., Bogacheva N.V., Korzhuk A.V., Shlyahunt V.N., Mescheryakova I.A., Romancev V.A., Bochkov D.V., Zadorozhnyy A.V., Peltek S.E. Cloning and expression of a cellulase gene from *Penicillium* sp. 'occitanis' in *Komagataella phaffii* T07. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;7(4):194-200. DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-24 (in Russian)

Введение

Целлюлоза – это β -1,4-связанный полимер D-глюкозы, один из основных компонентов клеточной стенки растений, самый массовый компонент биосферы и наиболее распространенный возобновляемый источник углерода на Земле. Ежегодная продукция целлюлозы составляет примерно 10^{12} т в год (Tomme et al., 1995; Watanabe et al., 2001). В связи с такими значительными объемами ежегодной продукции целлюлоза является важным компонентом круговорота углерода в биосфере. Целлюлоза клеточной стенки находится в составе пространственного комплекса с гемицеллюлозой и лигнином. Три полимера, входящие в состав клеточной стенки, обладают разными свойствами и совместно обеспечивают физическую и химическую стойкость лигноцеллюлозы, которая обеспечивает структурную функцию растительной биомассы.

Биологическое разложение лигноцеллюлозы в природе происходит под воздействием большой группы ферментов: целлюлаз, гемицеллюлаз и лакказ. В большинстве случаев полный комплекс лигноцеллюлозоразрушающих ферментов синтезируется группой организмов. Непосредственно разрушение целлюлозы осуществляют три типа ферментов: экзо- β -1,4-глюканаза (EC 3.2.1.91), эндо- β -1,4-глюканаза (EC 3.2.1.4) и β -1,4-глюкозидаза (EC 3.2.1.21) (Gao et al., 2008). Основные деструкторы целлюлозы – это грибы, они же служат источником большинства генов β -1,4-гликозид гидролаз, применяемых в технологических процессах.

Первой коммерчески доступной целлюлазой стал ферментный препарат, получаемый из белков, секретируемых грибом *Trichoderma reesi* (Wang et al., 2013). Секрет *T. reesi* состоит из комплекса генов β -1,4-гликозид гидролаз и используется в основном для разложения лигноцеллюлозной биомассы. Параллельно с развитием методов молекулярной биологии, белковой и геномной инженерии исследователи осуществили оптимизацию этого комплекса, а позднее перенесли синтез препарата в другие, уже рекомбинантные продуценты (Bhati, Sharma, 2021). По мере роста спектра применений целлюлаз и повышения требований к их стабильности происходил поиск новых генов, более адап-

тированных к требованиям технологических процессов целлюлаз. В том числе возникла потребность в получении препаратов, состоящих из отдельных целлюлаз (Kumar et al., 2019; Siqueira et al., 2020; Niyonzima, 2021). Поиск новых генов целлюлаз остается актуальным и в настоящее время, что связано как с общим развитием биотехнологического направления, так и с развитием локальных производств ферментов.

В исследовании мы использовали дрожжи *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*), которые применяются в качестве продуцента рекомбинантного белка с 70-х годов прошлого столетия (Ahmad et al., 2014). Эти дрожжи обладают развитой системой секреции белков и способностью к росту до очень высоких плотностей культуры, что позволяет получать ферменты в высокой концентрации (Bill, 2014). Дрожжевая система экспрессии гетерологичных белков становится все более популярной ввиду удобства ее использования в производственных условиях.

За последние несколько лет опубликованы работы, посвященные экспрессии эндоглюканаз в *K. phaffii*. Так, с 2018 г. успешно экспрессированы целлюлаза из: *Aspergillus fumigatus* (Vianna Bernardi et al., 2019), *A. awamori* (Liu et al., 2020), *Thermoascus aurantiacus* (Jain et al., 2018), *Sclerotinia sclerotiorum* (Chahed et al., 2018), *Reticulitermes speratus* (Zhang et al., 2018), *Thermoanaerobacter brockii* (Javanmard et al., 2021) и др. В работе (Javanmard et al., 2021) выполнено клонирование целлюлазы из гриба *T. brockii*. Помимо анализа полученного рекомбинантного белка показано положительное влияние введения нескольких копий экспрессирующей конструкции на уровень наработки белка (Javanmard et al., 2021).

В настоящее время одним из наиболее значимых источников информации о последовательностях генов микроорганизмов становятся открытые базы данных. В связи с увеличением объемов секвенирования постоянно растет объем информации о геномах микроорганизмов, что приводит к экспоненциальному росту данных о геномных последовательностях. Мы провели поиск генов целлюлаз и обнаружили ряд генов, которые ранее не были изучены. Эти последовательности использовали для получения реком-

бинантного белка с предсказанными свойствами, не имея генетического материала микроорганизма, в котором ген был обнаружен.

Материалы и методы

Конструирование экспрессионных кассет и интеграционного вектора. Поиск гена целлюлазы. Для получения последовательностей генов белков, адаптированных для экспрессии в *K. phaffii*, были удалены сигнальные пептиды, обнаруженные в аминокислотных последовательностях при помощи программы SignalP-5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Последовательность гена была оптимизирована для экспрессии в *K. phaffii* фирмой ATG:biosynthetics (Германия). Для сборки экспрессирующей конструкции применены метод Gibson Assembly и набор NEBuilder HiFi 2X Master Mix (NewEnglandBiolabs, США), согласно инструкции производителя. Фрагменты для сборки амплифицировали при помощи ПЦП с высокоточной полимеразой Q5® High-Fidelity 2X Master Mix (NewEnglandBiolabs). Для получения фрагментов с перекрывающимися концами были взяты праймеры с довесками (табл. 1).

Для сборки плазмиды, несущей четыре копии конструкции, экспрессирующей ген целлюлазы, амплифицировали экспрессирующую конструкцию праймерами BglAoxProm_F и BamHIAoxTerm_R с использованием Q5 полимеразы. Полученный фрагмент обрабатывали рестриктазами MspI, BglII и BamHI, очищали на магнитных частицах и клонировали в плазмиду pPZL-BGLU-Росс, обработанную рестриктазой BglIII. Процедуру повторяли три раза, поэтапно наращивая копийность.

Конструирование штамма продуцента. Электрокомпетентные клетки трансформировали плазмидой pPZL-4xBGLU-Росс, несущей четыре копии конструкции, экспрессирующей ген целлюлазы *Penicillium* sp. 'occitanis'. Добавляли к компетентным клеткам 1 мл одномолярного раствора сорбитола и инкубировали в течение 2 ч при 30 °С. После чего высевали часть культуры на агаризованную среду YPD с зеотином в качестве селективного антибиотика. Чашки Петри культивировали в течение 3 суток при 30 °С.

Отбор клонов. Для отбора клонов с наибольшей целлюлазной активностью выросшие колонии *K. phaffii* T07, трансформированные плазмидой pPZL-4xBGLU-Росс, засеивали в 24-луночный планшет с глубокими лунками. Каждую колонию помещали в отдельную ячейку, содержащую 2 мл YPGM с 0.3 % глюкозы и 1 % метанола. В качестве отрицательного контроля был штамм *K. phaffii* T07 без встроенного гена целлюлазы. Планшет инкубировали в термошейкере при 30 °С, 380 об/мин в течение 3 суток. Каждые сутки добавляли 20 мкл метанола в каждую ячейку планшета.

На четвертые сутки культивирования отбирали по 500 мкл культуры из каждой ячейки планшета, переносили в 1.5 мл пробирки, осаждали клетки центрифугированием при 4000 г в течение 15 мин. Полученный супернатант использовали для определения целлюлазной активности.

Культивирование штамма продуцента в биореакторе. Культивирование рекомбинантного штамма *K. phaffii* T07 в ферментере осуществляли в соответствии с методом, описан-

ном в руководстве по системе экспрессии Pichia Expression Kit (Invitrogen). Отдельные колонии штамма *K. phaffii* T07 с чашки YPD с зеотином (200 мкг/мл) инокулировали в 5 мл среды YPD с зеотином (200 мкг/мл) и культивировали в течение ночи при 30 °С в качестве посевной культуры. Посевную культуру (4 мл) дополнительно инокулировали в 400 мл (4 колбы на 500 мл по 100 мл среды) смеси сред YPD и YNB (1:4) с 2 % глюкозы и культивировали в течение 48 ч при 30 °С и 250 об/мин.

Для инокуляции 4 л солевой среды, содержащей 32.5 г/л глицерина, 9.375 г/л $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.875 г/л $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.9375 г/л NaCl, 3.75 г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3.75 г/л KH_2PO_4 в 7.5-литровом ферментере Pro-Lab (Биотехно, Москва) использовали 400 мл культуры. Культивирование проводили при 30 °С с постоянным потоком воздуха 3 л/мин. Начальная скорость вращения мешалки составила 400 об/мин. Содержание растворенного кислорода поддерживали на уровне более 20 % при помощи постепенного увеличения скорости вращения мешалки до 1200 об/мин, pH среды поддерживали на уровне 5.9, используя 10 М раствор NaOH. Перед инокуляцией в среду добавляли 2.5 мл/л микроэлементов (табл. 2), 2.5 мл/л витаминов (табл. 3) и 0.25 г/л ампициллина.

После выедания глицерина культурой биомасса достигает ~90 г/л. Момент полного выедания глицерина отслеживали по резкому увеличению содержания растворенного кислорода. При проявлении скачка кислорода переходили на стадию индукции и добавляли в биореактор через 0.2 микронный фильтр 2 мл/л микроэлементов и 2 мл/л 50 % раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Далее переводили культуру на питание метанолом, который является индуктором промотора *AOX1*, для чего применяли 60 % метанол. Стадию индукции начинали с добавления 40 мл индуктора и снижения температуры до 27 °С. Как только культура адаптировалась к метанолу и уровень кислорода опускался ниже 20 %, запускали периодическую подпитку метанолом. Подпитку проводили по 4 мл индуктора каждые 20 мин первые три часа после индукции и по 6.7 мл индуктора до конца культивирования, при резком росте растворенного кислорода выше 25 % добавляли 40 мл индуктора. Периодически собирали образцы для мониторинга ферментативной активности культуральной жидкости и роста биомассы. По достижению культурой массы 150 г/л опускали температуру культуры до 23 °С. Культивирование проводили в течение 72 ч после начала индукции.

Методика определения целлюлазной активности в супернатанте. За основу для определения ферментативной активности взяли методику, описанную в учебном издании Х. Биссвангера «Практическая энзимология» (2010). Метод заключается в расщеплении карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) ферментом до восстанавливающих сахаров и восстановлении ими 3.5-динитросалициловой кислоты (ДНСК) до 3-амино-5-нитросалициловой кислоты, обладающей красно-оранжевой окраской, интенсивность которой определяют колориметрически при длине волны 546 нм.

Для данной методики отбирали супернатант, полученный путем центрифугирования клеточной культуры дрожжей. Супернатант смешивали с 1 % КМЦ и инкубировали в течение 20 мин, после чего к реакционной смеси добавля-

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе

Название	Нуклеотидная последовательность
Aox-term_to_gene_F	5'-GCCTTAGACATGACTGTTCTCCTCAGT-3'
alpha_to_gene_R	5'-AGCTTCAGCCTCTCTTTTCTCG-3'
BGLU_Почч_pPZL_gibsonF	5'-CGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGCCGGTGCTGTTAAAAGTGTAC-3'
BGLU_Почч_pPZL_gibsonR	5'-AGGAACAGTCATGTCTAAGGCTTAAGGGAAGTAGGACTCAAGAATGGAC-3'
BglAoxProm_F	5'-atgcatgcAGATCTAACATCCAAGACGAAAGG-3'
BamHIAoxTerm_R	5'-atgcatgcGGATCCGCACAAACGAAGG-3'

Таблица 2. Раствор микроэлементов

Компонент	Кол-во (г) на 1000 мл
Сульфат меди 5-водный ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	3
Иодид натрия (NaI)	0.4
Сульфат марганца (MnSO_4)	2
Молибдат натрия 2-водный ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1
Борная кислота (H_3BO_3)	0.1
Хлорид кобальта 6-водный ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.5
Сульфат железа 7-водный ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	33
Серная кислота (H_2SO_4)	5 мл
Сульфат цинка ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	5

Таблица 3. Раствор витаминов

Компонент	Кол-во (г) на 1000 мл
Биотин	0.0508
Пантотенат кальция	0.2
Фолиевая кислота	0.01
Инозитол	1
Ниацин	0.2
p-Аминобензойная кислота	0.1
Пиридоксина гидрохлорид	0.2
Рибофлавин	0.1
Тиамин гидрохлорид	0.2

ли два объема 1 % ДНСК. Эту смесь прогревали при 95 °С в течение 10 мин, затем охлаждали до комнатной температуры. Оценку активности созданных ферментных препаратов проводили на спектрофотометре Epoch BioTek с помощью программного обеспечения Gen5. В лунки спектрофотометрического планшета наносили по 200 мкл анализируемой смеси.

Определение pH оптимума и стабильности. Для каждой реакции объемом 100 мкл отбирали по 50 мкл культуральной жидкости и добавляли 50 мкл 1 % КМЦ. Для каждого pH был приготовлен отдельный раствор 1 % КМЦ, диапазон pH – от 6.5 до 10 с шагом 0.5. Реакции проводили

в 96-луночном планшете на амплификаторе T100 (Bio-Rad, США) в течение 20 мин при температуре 40 °С. После окончания инкубации 75 мкл реакционной смеси смешивали с 150 мкл ДНСК и инкубировали в течение 10 мин при 95 °С.

Определение температурного оптимума. Для каждой реакции объемом 100 мкл отбирали по 50 мкл культуральной жидкости и добавляли 50 мкл 1 % КМЦ с pH буферного раствора 6.5. Реакции проводили в 96-луночном планшете на амплификаторе T100 (Bio-Rad) в градиенте температур от 45 до 70 °С в течение 20 мин. После окончания инкубации 75 мкл реакционной смеси смешивали с 150 мкл ДНСК и инкубировали в течение 10 мин при 95 °С.

Очистка и SDS-PAGE. Все операции проводили при температуре, не превышающей (3 ± 2) °С. Культуральную жидкость центрифугировали в течение 25 мин при 4000 об/мин. Супернатант очищали от низкомолекулярных примесей и концентрировали в 20 раз методом ультрафильтрации с использованием центрифужных концентраторов типа Vivaspin 20 и картриджей, имеющих размер пор мембраны 10 кДа. Для постановки SDS-PAGE концентрат промывали дистиллированной водой.

Полученный ферментативный препарат упаривали в 20 раз на центрифужном испарителе Concentrator plus (Eppendorf), смешивали с Laemmli буфером (62.5 мМ Трис-НСI pH 6.8, 25 % глицерина, 2 % ДСН, 0.01 % бромфенолового синего, 5 % меркаптоэтанол) в соотношении 1:2 и нагревали при 95 °С в течение 5 мин, затем по 30 мкл наносили в карманы 4 % концентрирующего полиакриламидного геля (4 % смеси акриламида с бисакриламидом 37.5:1,125 мМ Трис-НСI pH 6.8, 0.1 % ДСН, 0.5 % персульфата аммония и 0.1% N, N, N', N'-тетраметилэтилендиамин). Разделение образцов проводили в 12 % полиакриламидном геле (12 % смеси акриламида с бисакриламидом 37.5:1.375 мМ Трис-НСI pH 8.8, 0.1 % ДСН, 0.5 % персульфата аммония и 0.05 % N, N, N', N'-тетраметилэтилендиамин) при 200 В на гель в трис-глициновом буфере (25 мМ трис, 192 мМ глицин, 0.1 % ДСН). Гель окрашивали по Кумасси и визуализировали при помощи гелъдокументирующей системы VersaDoc (Bio-Rad).

Результаты

Поиск гена

Последовательности целлюлаз можно найти при использовании гомологии к уже известным в настоящее время ферментам, с применением алгоритмов множественного выравнивания и информации из открытых баз данных.

Наиболее стабильной среди грибных целлюлаз является описанная ранее β-глюканаза из термотолерантного гриба *Talaromyces emersonii* (Wang et al., 2014). Последовательность целлюлазы приведена далее:

>AHV83755.1 glucanase Egl5A (*Rasamsonia emersonii*)

MKFSRVVCGLTEAGGALAAPVKEKGIKKRASPFQWFGSNESGAEF-
GNNNIPGVEGTDYTFPNTSAIQILIDQGMNIFRVPFLMERMVPMQ-
TGPVDSAYFQGSQVINYITSHGASAVIDPHNFGRYNNIISSPSD-
FQTFWHTIASNFADNDNVIFDTNNEYHDMDESLLVQLNQAADGI-
RAAGATSQYIFVEGNSWTGAWTWTQVNDAMANLTDQNKIVYEM-
HQYLDSDGSGTSDQCVNSTIGQDRVESATAWLKQNGKKAILEY-
AGGANSVCETAVTGMLDYLANNNTDVWTGAIWWAAGPWWGDYIF-
SMEPPSGIAYEQVLPPLPKYLE

С помощью этой последовательности был выполнен поиск похожих генов. В результате была найдена группа генов, имеющих уровень гомологии более 30 % к эталонной последовательности, среди которых для работы была отобрана следующая последовательность:

>PCH03425.1 Glycoside hydrolase, superfamily (*Penicillium* sp. 'occitanis')

MAGAVKVTTLKTRTSDSSENTSQENLITMKTISIIVLSTAGLTL-
GAPSKDTKKRASSFEWFGSNESGAEFSGNIPGVEGTDYTFPNT-
TAIQILIDAGMNIIFRVPFLMERMIPTEMTGSLNTAYFEGYSEVINIYIT-
GQGAHAVVDPHNFGRYGTPISSTSDQTFWSTLASQFKSND-
KVIFDTNNEYHDMDESLLVVALNQAADGIRDAGATTQYIFVEGN-
SYTGAWTWTYNTAMVNLTDPSDLIVYEMHQYLDSDGSGTSD-
DQCVSSTIGQERVVDATTWLQTNKRGILGEFAGGANSVCCEAVK-
GMLNYLEQNSDVWLGASWWSAGPWWGDYIFSMEPPSGTAYV-
NYLSILESYFP

Последовательность была найдена в геноме, аннотированном при подготовке работы, направленной на изучение патогенности грибов к растениям (Bravo-Ruiz et al., 2017). По этой последовательности была получена химически синтезированная последовательность гена с кодонным составом, оптимизированным для экспрессии в *K. phaffii* (данные не представлены).

Конструирование вектора

С применением полученной ранее в лаборатории плазмиды rPZL была сконструирована плаزمида на основе вектора rPZL, несущая конструкцию, экспрессирующую целлюлазу *P. sp. 'occitanis'* под контролем промотора и терминатора гена *AOX1*. Далее плаزمида rPZL-BGLU-Росс была использована для конструирования плазмиды rPZL-4xBGLU-Росс, несущей четыре копии конструкции, экспрессирующей ген целлюлазы *P. sp. 'occitanis'*, как это принято в биотехнологической промышленности.

Скрининг наиболее активных клонов

Плаزمида rPZL-4xBGLU-Росс была клонирована в штамм *K. phaffii* T07 при помощи электропорации. Выросшие на селективной среде на 3-й день колонии были проверены на наличие целлюлазной активности. Все проанализированные клоны (16) продемонстрировали целлюлазную активность. Клон, проявивший наибольшую активность, был использован для дальнейшей работы. Штамму было присвоено название *K. phaffii* T07 BGLU-4xPOcc.

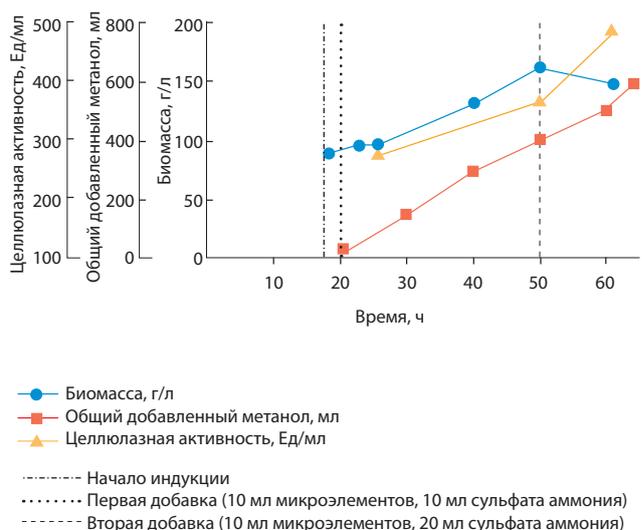


Рис. 1. Параметры роста культуры *K. phaffii* T07 BGLU-4xPOcc при культивировании в биореакторе

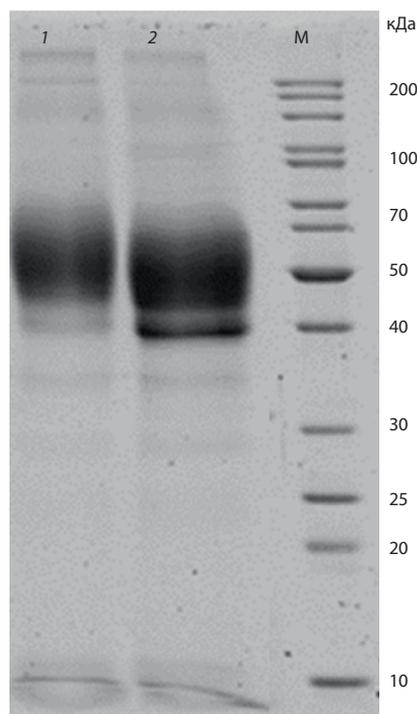


Рис. 2. Гель с разделенными образцами концентрированных культуральных жидкостей штаммов, экспрессирующих эндоглюканазу *Penicillium* sp. 'occitanis' (1, 2).

M – маркер молекулярного веса (кДа, приведен справа)

Наработка ферментативного препарата

Выбранный штамм культивировали в биореакторе, согласно методике, представленной в разделе «Материалы и методы». Культивирование длилось 42 ч после индукции, максимум целлюлазной активности был через 40 ч после индукции. Наибольшее содержание биомассы – через 32 ч после начала индукции (рис. 1). Максимальная активность,

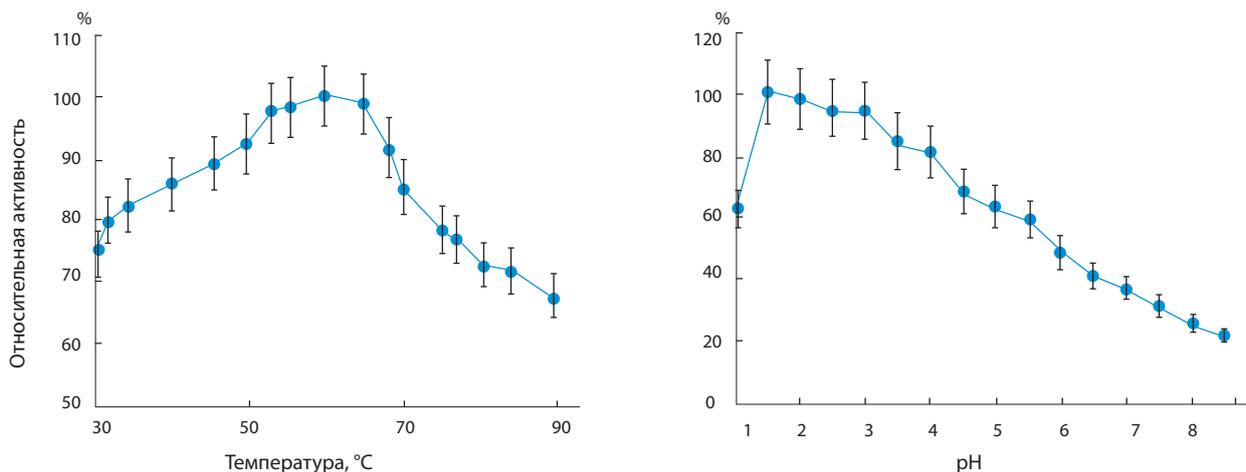


Рис. 3. Зависимость активности фермента целлюлазы *P. sp. 'occitanis'* от температуры (слева) и pH (справа)

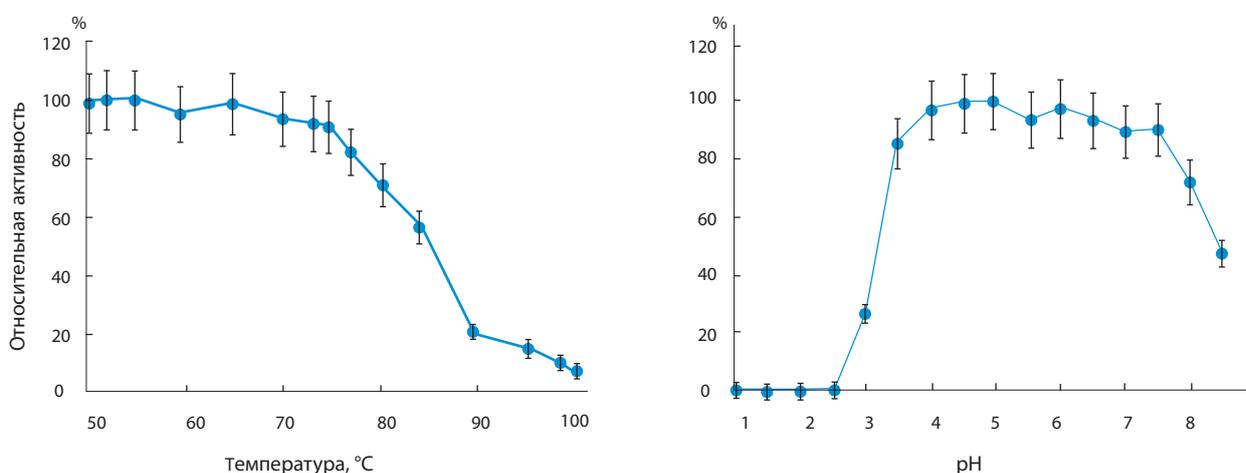


Рис. 4. Зависимость стабильности фермента целлюлазы *P. sp. 'occitanis'* от температуры (слева) и pH (справа)

которая была получена при культивировании в биореакторе, составила ~4 000 000 Ед/л культуральной жидкости.

Анализ препарата при помощи SDS-PAAG

Созданный в ходе ферментации ферментативный препарат исследовали при помощи SDS-PAAG, согласно методике, приведенной в разделе «Материалы и методы» (рис. 2).

На полученном геле-электрофорезе можно наблюдать достаточно четкую полосу чуть ниже 40 кДа, которая соответствует расчетной молекулярной массе рекомбинантного белка целлюлазы *P. sp. 'occitanis'*, составляющей 39 562.67 Да. Выше этой полосы наблюдается бэнд в виде широкой области, примерно от 42 до 70 кДа. Предположительно, это рекомбинантный белок с разным уровнем гликозилирования.

Определение свойств фермента

Поставлен эксперимент по выявлению активности при разных температурах и pH (рис. 3). Эксперименты проводили в трех повторностях.

Согласно полученным данным, оптимум активности фермента целлюлазы *P. sp. 'occitanis'* находится в диапазоне температуры 55–65 °C и pH 1.5–3. Активность имеет практически линейную обратную зависимость от pH и в условиях эксперимента постепенно растет от 8.5 до 1.5. Далее при pH = 1 начинает резко снижаться. Зависимость активности от температуры имеет классический куполообразный вид.

Поставлен эксперимент по определению стабильности фермента при разных значениях температуры и pH. Для определения pH стабильности фермент выдерживали при температуре 50 °C и pH от 1 до 8.5. Затем осуществляли ферментативную реакцию. Для определения оптимума температуры фермент выдерживали при pH 8.0 и температурах от 50 до 100 °C. После чего проводили ферментативную реакцию (рис. 4). Эксперименты выполняли в трех повторностях.

Фермент сохраняет стабильность при температуре ниже 75 °C в течение 4 ч, а при 85 °C за 4 ч теряет 50 % активности. Он стабилен при pH от 4 до 7.5.

Заключение

Выполнены клонирование и анализ свойств ранее не исследованного белка целлюлазы из *P. sp. 'occitanis'*. Ген был обнаружен в базе NCBI. Синтезирован ген с кодонной последовательностью, адаптированной для экспрессии в дрожжах *K. phaffii*. Получена плазида pPZL-4xBGLU-Росс, несущая четыре копии конструкции, экспрессирующей ген целлюлазы *P. sp. 'occitanis'*. Плазида клонирована в штамм дрожжей *K. phaffii* T07 под контроль промотора и терминатора гена *AOX1*. Было клонировано четыре копии экспрессирующей ген конструкции в геном. В результате получен штамм *K. phaffii* T07 BGLU-4xРосс. Максимальный уровень экспрессии полученного штамма составил ~4 000 000 Ед/л культуральной жидкости при культивировании в 5-литровом биореакторе. Полученный белок, согласно результатам гель-электрофореза, дает полосу ~39.5 кДа, что соответствует расчетному весу, и обширную область примерно от 42 до 70 кДа, формирование которой говорит о гликозилировании белка при экспрессии в *K. phaffii*.

Анализ свойств фермента показал, что оптимум активности наблюдался при 55–65 °С, и рН 1.5–2. Фермент сохраняет 50 % активности при рН от 1.5 до 6 и от 30 до 80 °С. Он также сохраняет стабильность при температуре ниже 75 °С в течение 4 ч, а при 85 °С за 4 ч теряет 50 % активности. Фермент стабилен при рН от 4 до 7.5. Несмотря на то что оптимум ферментативной активности рН находится около 2, целесообразно использовать фермент при более высоких значениях рН ~4, так как при этом фермент стабилен.

Список литературы / References

- Биссвангер Х. Практическая энзимология. Пер. с англ. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2010;154-156.
[Bisswanger H. Practical Enzymology. Moscow: Binom Publ., 2010;154-156. (in Russian)]
- Ahmad M., Hirz M., Pichler H., Schwab H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014;98(12):5301-5317. DOI 10.1007/s00253-014-5732-5.
- Bhati N., Sharma A.K. Cost-effective cellulase production, improvement strategies, and future challenges. *J. Food Process Eng.* 2021;44(2):e13623. DOI 10.1111/jfpe.13623.
- Bill R.M. Playing catch-up with *Escherichia coli*: using yeast to increase success rates in recombinant protein production experiments. *Front. Microbiol.* 2014;5:85. DOI 10.3389/fmicb.2014.00085.
- Bravo-Ruiz G., Sassi A.H., Marcet-Houben M., Di Pietro A., Gargouri A., Gabaldon T., Roncero M.I.G. Regulatory mechanisms of a highly pectinolytic mutant of *Penicillium occitanis* and functional analysis of

- a candidate gene in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Front. Microbiol.* 2017;8:1627. DOI 10.3389/fmicb.2017.01627.
- Chahed H., Boumaiza M., Ezzine A., Marzouki M.N. Heterologous expression and biochemical characterization of a novel thermostable *Sclerotinia sclerotiorum* GH45 endoglucanase in *Pichia pastoris*. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018;106:629-635. DOI 10.1016/j.jbiomac.2017.08.062.
- Gao J., Weng H., Zhu D., Yuan M., Guan F., Xi Y. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. *Bioresour. Technol.* 2008;99(16):7623-7629. DOI 10.1016/j.biortech.2008.02.005.
- Jain K.K., Kumar S., Bhardwaj K.N., Kuhad R.C. Functional expression of a thermostable endoglucanase from *Thermoascus aurantiacus* RCKK in *Pichia pastoris* X-33 and its characterization. *Mol. Biotechnol.* 2018;60(10):736-748. DOI 10.1007/s12033-018-0106-3.
- Javanmard A.S., Matin M.M., Bahrami A.R. Polycistronic cellulase gene expression in *Pichia pastoris*. *Biomass Convers. Biorefin.* 2021;1-13. DOI 10.1007/s13399-021-01765-7.
- Kumar V.A., Kurup R.S.C., Snishamol C., Prabhu G.N. Role of cellulases in food, feed, and beverage industries. In: Parameswaran B., Varjani S., Raveendran S. (Eds.). *Green Bio-processes. Energy, Environment, and Sustainability*. Singapore: Springer, 2019;323-343. DOI 10.1007/978-981-13-3263-0_17.
- Liu X., Jiang Z., Ma S., Yan Q., Chen Z., Liu H. High-level production and characterization of a novel β -1,3-1,4-glucanase from *Aspergillus awamori* and its potential application in the brewing industry. *Process Biochem.* 2020;92:252-260. DOI 10.1016/j.procbio.2020.01.017.
- Niyonzima F.N. Detergent-compatible fungal cellulases. *Folia Microbiol.* 2021;66(1):25-40. DOI 10.1007/s12223-020-00838-w.
- Siqueira J.G.W., Rodrigues C., de Souza Vandenbergh L.P., Woiciechowski A.L., Soccol C.R. Current advances in on-site cellulase production and application on lignocellulosic biomass conversion to biofuels: a review. *Biomass Bioenergy.* 2020;132:105419. DOI 10.1016/j.biombioe.2019.105419.
- Tomme P., Warren R.A.J., Gilkes N.R. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv. Microb. Physiol.* 1995;37:1-81. DOI 10.1016/S0065-2911(08)60143-5.
- Vianna Bernardi A., Kimie Yonamine D., Akira Uyemura S., Magnani Dinamarco T. A thermostable *Aspergillus fumigatus* GH7 endoglucanase over-expressed in *Pichia pastoris* stimulates lignocellulosic biomass hydrolysis. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(9):2261. DOI 10.3390/ijms20092261.
- Wang K., Luo H., Shi P., Huang H., Bai Y., Yao B. A highly-active endo-1,3-1,4- β -glucanase from thermophilic *Talaromyces emersonii* CBS394.64 with application potential in the brewing and feed industries. *Process Biochem.* 2014;49(9):1448-1456. DOI 10.1016/j.procbio.2014.06.003.
- Wang S., Liu G., Wang J., Yu J., Huang B., Xing M. Enhancing cellulase production in *Trichoderma reesei* RUT C30 through combined manipulation of activating and repressing genes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2013;40(6):633-641. DOI 10.1007/s10295-013-1253-y.
- Watanabe H., Tokuda G. Animal cellulases. *Cell. Mol. Life Sci.* 2001;58(9):1167-1178. DOI 10.1007/PL00000931.
- Zhang P., Yuan X., Du Y., Li J.J. Heterologous expression and biochemical characterization of a GHF9 endoglucanase from the termite *Reticulitermes speratus* in *Pichia pastoris*. *BMC Biotechnol.* 2018;18:35. DOI 10.1186/s12896-018-0432-3.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 01.11.2021. После доработки 25.11.2021. Принята к публикации 25.11.2021.

 pismavavilov.ru

DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-25

Обзор

Научная компонента селекции (по вопросам, поднятым в спецвыпуске «Вавиловского журнала генетики и селекции», 2021, Т. 25, № 4)

В.И. Глазко✉

Для цитирования: Глазко В.И. Научная компонента селекции (по вопросам, поднятым в спецвыпуске «Вавиловского журнала генетики и селекции», 2021, Т. 25, № 4). *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;7(4):201-205. DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-25

Review

The scientific component of breeding: questions raised in the special issue of the Vavilov Journal of Genetics and Breeding, 2021;25(4)

V.I. Glazko✉

For citation: Glazko V.I. The scientific component of breeding: questions raised in the special issue of the Vavilov Journal of Genetics and Breeding, 2021;25(4). *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;7(4):201-205. DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-25 (in Russian)

Посмотрев спецвыпуск «Вавиловского журнала генетики и селекции» (2021, Т. 25, № 4), посвященный современному состоянию селекции растений в РФ, хотел бы сделать несколько замечаний, – сугубо основанных на моем частном опыте и сложившемся мнении. Бесконечно согласен с положениями и утверждением о том, что основа государственной безопасности РФ лежит в организации и ведении сельского хозяйства, в частности в растениеводстве, изложенными в предисловии к выпуску (Гончаров, Косолапов, 2021) и статье Н.П. Гончарова (2021). И что нет не только стратегии, но и научно обоснованных тактических решений. Понятно, что, к сожалению, все это определяется отсутствием достаточного вклада научного сообщества, деградация которого обнаруживается не только в нашем отечестве, но отражает глобальные мировые тенденции. Важно также отметить и то, что состояние нашего научного сообщества определяется еще и тем фактом, что тридцать лет назад плановая эконо-

номика проиграла рыночной, не заметив, что рыночная – основана на рекламе, причем наукоёмкой. С чем плановая экономика фактически не была знакома. Естественно, ее, как и научное сообщество, легко можно было убедить в том, что они – второго сорта. Именно с тех пор большое количество научных подразделений работает как «бюро перевода» англоязычных статей на русский язык, и новизна исследований определяется новизной – объектов...

Н.П. Гончаров (2021) четко формулирует проблему и прямо указывает адреса государственных структур и необходимые изменения, которые они должны принять, – с целью улучшения ситуации с фундаментальными проблемами той части аграрной цивилизации, которая локализована на территории России.

Хотелось бы изложить несколько моих соображений по поводу селекции и направлений ее ускорения. Прежде всего мы должны определиться со стратегией развития раз-

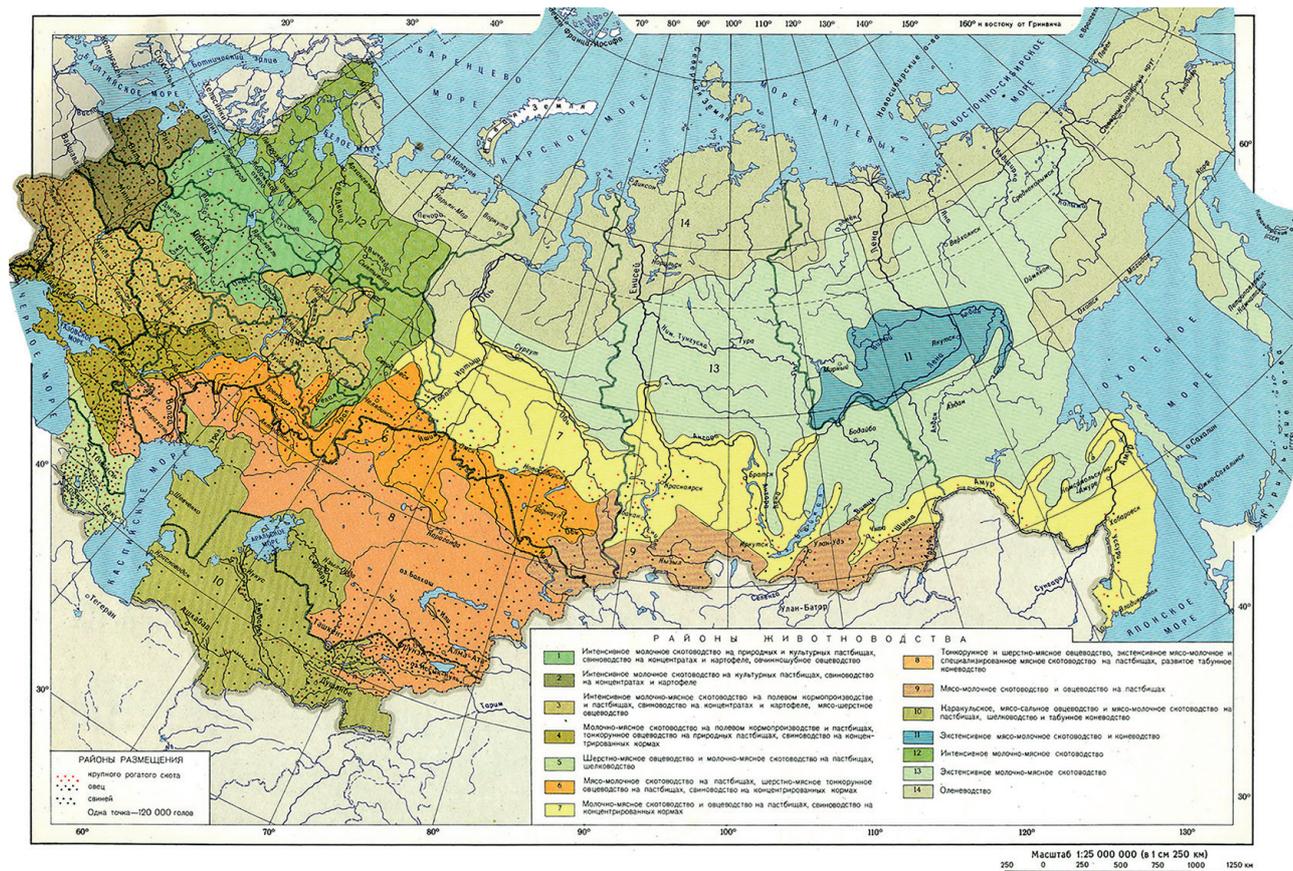


Рис. 1. Распределение систем производства животноводческой продукции на территории РФ (из: Географический атлас..., 1985)

личных направлений селекционной работы и обязательной ее адресностью. В качестве объяснения моей позиции хотел бы привести две иллюстрации. Одна – это области высокозатратного и пастбищного животноводства на территории России (рис. 1).

Легко увидеть, что первое сосредоточено в основном до Урала, второе – за ним, за исключением областей вокруг городов-миллионников. Понятно, что некоторые продукты научных разработок в области селекции, полученные в условиях высокзатратных животноводческих структур в «развитых странах», пытаются внедрить на всей территории РФ, что само по себе отражает непонимание отечественного разнообразия сельскохозяйственных систем. Вторая – это распространенность пастбищного животноводства в разных странах (рис. 2). В ней наглядно демонстрируется важность пастбищного скотоводства именно для России.

Из этого следует, что в каждом конкретном регионе рентабельность сельскохозяйственной работы будет иметь свои специфические ограничения. Они будут обусловлены разными факторами: в одном случае – климатом и почвами, в другом – логистикой или уровнями загрязнения. В конечном счете любые проблемы селекции сводятся к четырем направлениям – продуктивность, адаптивность, воспроизводство и сохранение биоразнообразия. В конкретных локалитетах будет преобладать своя компонента. В этой связи

очевидно, что должно быть подразделение направлений исследований, а именно: разработка инструментов выявления мишеней – факторов естественного и искусственного отборов, основанных на методах управления генетическими потоками в конкретных условиях воспроизводства сельскохозяйственных видов.

Пангеномика – очень важное направление, но оно никогда не будет успешной основой производства конкретных сортов культурных растений или пород животных просто потому, что фенотипические характеристики являются результатом взаимодействия слишком большого количества факторов и метагенома в том числе (рис. 3).

Прямая проекция фенотипических характеристик на пангеном невозможна еще и потому, что не существует прямых связей между продуктами структурных генов – протеомом и фенотипом, что хорошо иллюстрируется теми же авторами при сопоставлении между белковыми сетями и продуктами метаболизма, влияющими на работу этих сетей (рис. 4).

В чем пангеномика всегда будет иметь лидирующее значение – это, как ни странно, в основном, в трех направлениях: выявление аллельных вариантов структурных генов и элементов регуляторных сетей, которые служат мишенями факторов естественного отбора (см. работы Дениса Ларкина и другие по экологической геномике у сельскохозяй-

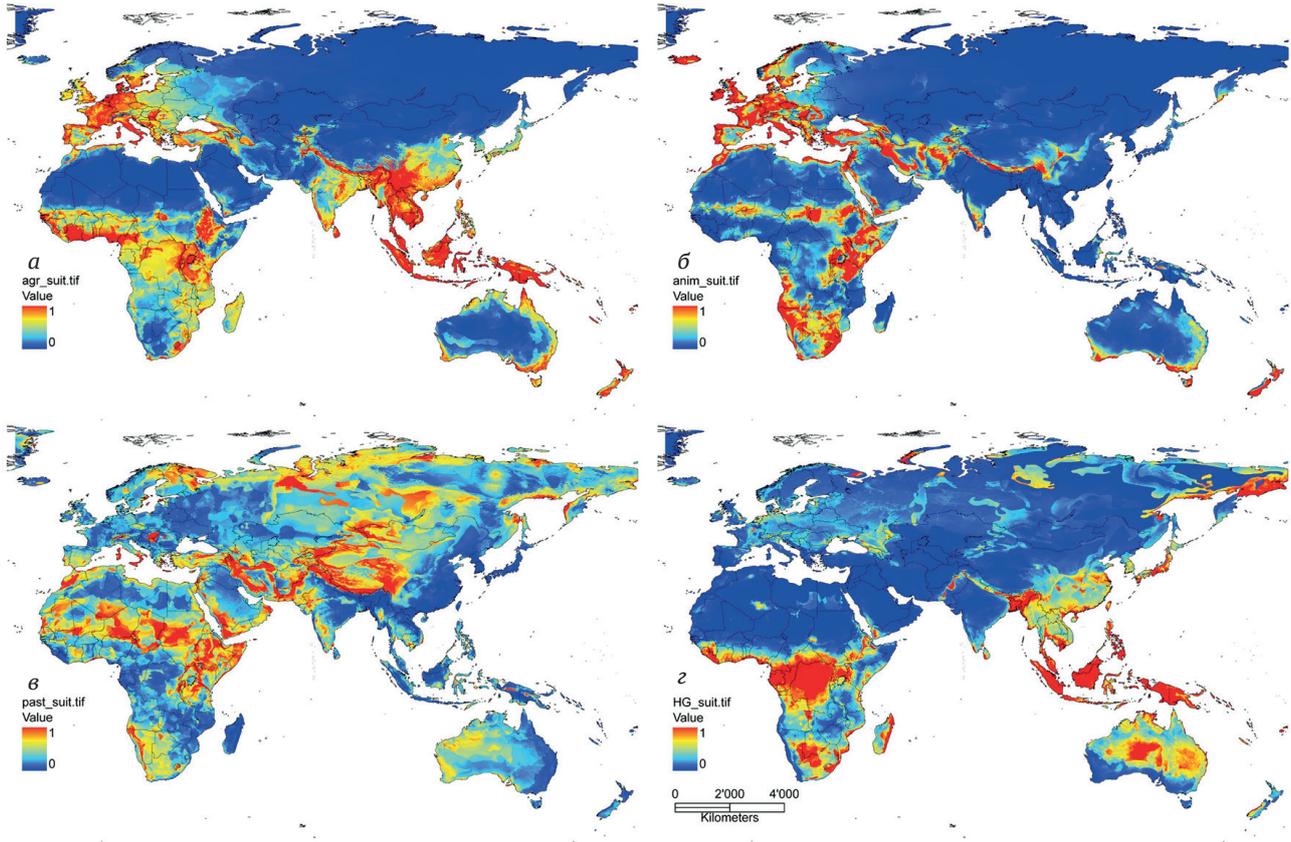


Рис. 2. Зависимость различных типов хозяйствования, и на 40% вклад в ВВП определяется только двумя параметрами – почвой и климатом (из: Beck, Sieber, 2010)

a – смешанное сельское хозяйство, *б* – оседлое животноводство, *в* – пастбищное скотоводство, *z* – охота и собирательство

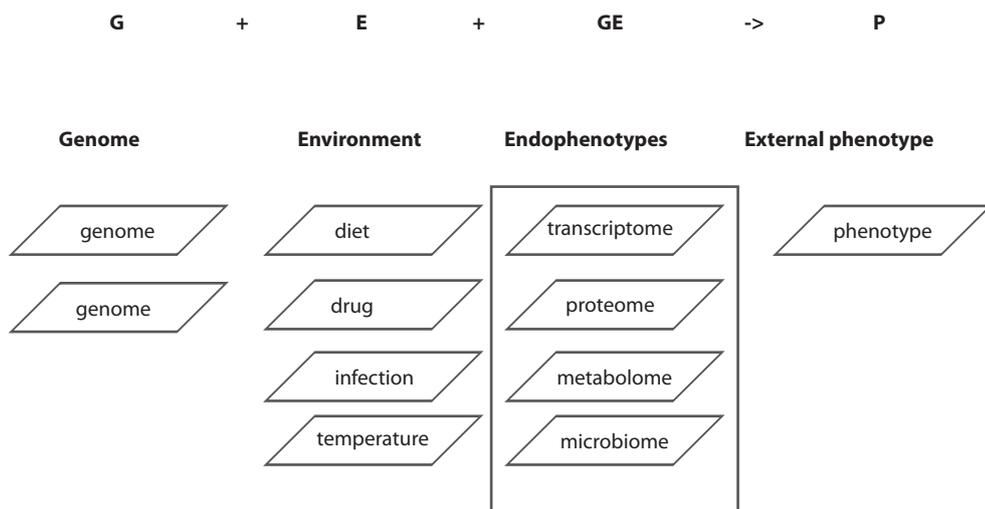


Рис. 3. Генотип и среда меняют эндофенотип животных, и вместе они меняют экзофенотип (из: Te Pas et al., 2017)

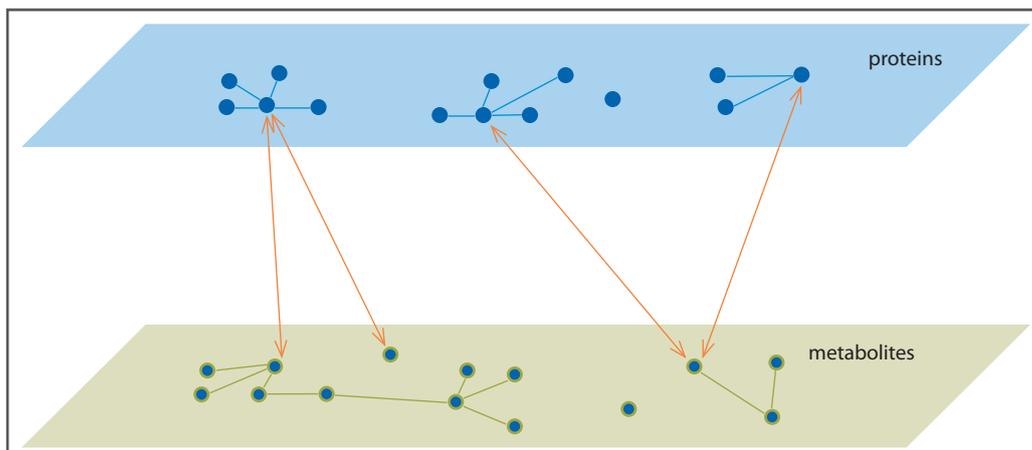


Рис. 4. Взаимодействия между элементами одного уровня организации биологических объектов (белки) и элементами другого уровня (метаболиты) (из: Te Pas et al., 2017)

ственных видов животных, например, Юдин, Ларкин, 2019; Yurchenko et al., 2019; Юдин и др., 2021; Sweet-Jones et al., 2021); накопление данных о неблагоприятных мононуклеотидных (SNP) рецессивных мутациях (потеря функции – Loss of Function (Cai et al, 2019), или, как называют на русском такие мутации, – «гаплотипы фертильности» (Зиновьева, 2016)); организация и смена программ генной экспрессии (работы Ирины Соловей по архитектонике интерфазного ядра, например (Feodorova et al., 2019)).

Эти направления позволяют выявить конкретные биомаркеры, контроль которых может способствовать увеличению успешности селекционной работы. В то же время нельзя преувеличивать значение пангеномики в решении традиционных вопросов селекционной работы особенно сейчас, в условиях быстрых изменений факторов окружающей среды.

Один из элементов противоречий между фундаментальными исследованиями и прикладными применениями полученных данных и заключается в том, что частные результаты первых быстро становятся модными и их пытаются выдать за универсальные. С этой точки зрения особую важность приобретает комплексный подход к каждой проблеме по усовершенствованию селекционной работы с конкретным генофондом и для конкретных условий и поиск ее конкретного адреса. Понятно, что в этой связи на меня самое большое впечатление среди очевидно добротных и интересных работ всего выпуска произвела статья В.М. Косолапова, В.И. Чернявских, С.И. Костенко (2021) и именно потому, что для начала они выполнили принципиально важную для стратегии развития современной селекции и семеноводства кормовых культур в России «ориентацию на местности», привязку к конкретным особенностям различных локалитетов России.

В свое время создатель аграрной экономики как науки А.В. Чайанов утверждал, что главная роль получения высшего аграрного образования заключается в том, что позволяет быть создателем и посредником между современными на-

учными достижениями и их внедрением в конкретное производство сельскохозяйственной продукции. Очевидно, что именно эта функция наиболее «заброшена» в отечественном сельском хозяйстве. Полагаю, что вышедший специальный выпуск по селекции растений «Вавиловского журнала генетики и селекции» в определенной степени поможет, по крайней мере, зафиксировать эту проблему и стать основой для ее решения.

Список литературы / References

- Географический атлас: для учителей сред. школы / отв. ред. Л.Н. Колосова, В.С. Чудинова. 4-е изд.; испр. М.: ГУГК, 1985.
[Geographical Atlas: for teachers of middle schools / Eds L.N. Kolosova, V.S. Chudinova. 4th edn; revised. Moscow: MDGM, 1985. (in Russian)]
- Гончаров Н.П. Научное обеспечение селекции и семеноводства Сибири в XXI веке. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(4):448-459. DOI 10.18699/VJ21.050.
[Goncharov N.P. Scientific support to plant breeding and seed production in Siberia in the XXI century. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(4):448-459. DOI 10.18699/VJ21.050.]
- Гончаров Н.П., Косолапов В.М. Селекция растений – основа продовольственной безопасности России. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(4):361-366. DOI 10.18699/VJ21.039.
[Goncharov N.P., Kosolapov V.M. Plant breeding is the food security basis in the Russian Federation. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(4):361-366. DOI 10.18699/VJ21.039.]
- Зиновьева Н.А. Гаплотипы фертильности голштинского скота. *С.-х. биология*. 2016;51(4):423-435. DOI 10.15389/agrobio.2016.4.423rus.
[Zinovieva N.A. Haplotypes affecting fertility in Holstein cattle. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya* = *Agricultural Biology*. 2016; 51(4):423-435. DOI 10.15389/agrobio.2016.4.423eng.]
- Косолапов В.М., Чернявских В.И., Костенко С.И. Развитие современной селекции и семеноводства кормовых культур в России. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(4):401-407. DOI 10.18699/VJ21.044.
[Kosolapov V.M., Chernyavskih V.I., Kostenko S.I. Fundamentals for forage crop breeding and seed production in Russia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(4):401-407. DOI 10.18699/VJ21.044.]

- Юдин Н.С., Ларкин Д.М. Общие признаки селекции и гены, связанные с адаптацией и акклиматизацией, в геномах российских пород крупного рогатого скота и овец. *Генетика*. 2019;55(8):936-943. DOI 10.1134/S0016675819070154.
[Yudin N., Larkin D.M. Shared signatures of selection related to adaptation and acclimation in local cattle and sheep breeds from Russia. *Russ J Genet*. 2019;55(8):1008-1014. DOI 10.1134/S1022795419070159.]
- Юдин Н.С., Юрченко А.А., Ларкин Д.М. Следы отбора и гены-кандидаты адаптации к экстремальным факторам среды в геномах турано-монгольских пород крупного рогатого скота. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(2):190-201. DOI 10.18699/VJ21.023.
[Yudin N.S., Yurchenko A.A., Larkin D.M. Signatures of selection and candidate genes for adaptation to extreme environmental factors in the genomes of Turano-Mongolian cattle breeds. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov journal of genetics and breeding*. 2021;25(2):190-201. DOI 10.18699/VJ21.023.]
- Beck J., Sieber A. Is the Spatial Distribution of Mankind's Most Basic Economic Traits Determined by Climate and Soil Alone? *PLoS ONE*. 2010;5(5):E10416. DOI 10.1371/journal.pone.0010416.
- Cai Z., Gulbrandtsen B., Lund M.S., Sahana G. Prioritizing candidate genes for fertility in dairy cows using gene-based analysis, functional annotation and differential gene expression. *BMC Genomics*. 2019;20(1):255. DOI 10.1186/s12864-019-5638-9.
- Feodorova Y., Falk M., Mirny L.A., Solovei I. Viewing Nuclear Architecture through the Eyes of Nocturnal Mammals. *Trends Cell Biol*. 2020;30(4):276-289. DOI 10.1016/j.tcb.2019.12.008.
- Sweet-Jones J., Lenis V.P., Yurchenko A.A., Yudin N.S., Swain M., Larkin D.M. Genotyping and Whole-Genome Resequencing of Welsh Sheep Breeds Reveal Candidate Genes and Variants for Adaptation to Local Environment and Socioeconomic Traits. *Front Genet*. 2021;12:612492. DOI 10.3389/fgene.2021.612492.
- Te Pas M.F., Madsen O., Calus M.P., Smits M.A. The Importance of Endophenotypes to Evaluate the Relationship between Genotype and External Phenotype. *Int J Mol Sci*. 2017;18(2):472. DOI 10.3390/ijms18020472.
- Yurchenko A.A., Deniskova T.E., Yudin N.S., Dotsev A.V., Khamiruev T.N., Selionova M.I., Egorov S.V., Reyer H., Wimmers K., Brem G., Zinovieva N.A., Larkin D.M. High-density genotyping reveals signatures of selection related to acclimation and economically important traits in 15 local sheep breeds from Russia. *BMC Genomics*. 2019; 20(Suppl. 3):294. DOI 10.1186/s12864-019-5537-0.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 16.07.2021. После доработки 24.10.2021. Принята к публикации 25.10.2021.

«Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции» – сетевое научное издание открытого доступа. Основано в 2015 году (до 2019 года выходило под названием «Письма в Вавиловский журнал»). На страницах издания публикуются результаты экспериментальных, методических и теоретических исследований, аналитические обзоры по всем разделам генетики и селекции, а также по смежным областям биологических и сельскохозяйственных наук; материалы и документы по истории генетики и селекции; описания сортов растений и пород животных; рецензии; письма, адресованные редактору; персоналии и мемориальные статьи; хроника и информация из региональных отделений Вавиловского общества генетиков и селекционеров.

Всем статьям присваивается DOI.

Входит в РИНЦ и DOAJ.

Цель издания – донести новейшие результаты фундаментальных и прикладных исследований в области генетики растений, животных, человека, микроорганизмов, описание новых методов и селекционных достижений до наибольшего числа ученых, включая специалистов из смежных областей науки и техники, а также до преподавателей вузов, читающих курсы лекций по генетике и селекции.

Регистрационное свидетельство СМИ Эл № ФС77-75536 выдано 08 мая 2019 года Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор).

Прием статей осуществляется через электронную почту редакции: pismavavilov@bionet.nsc.ru

Адрес издания в сети интернет: <http://pismavavilov.ru/>

При перепечатке материалов ссылка на журнал обязательна.

Учредитель и издатель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН)

Адрес учредителя и издателя: проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090

Адрес редакции: проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090

Телефон редакции: (383) 363 4963, доб. 5316

✉ Электронный адрес редакции: pismavavilov@bionet.nsc.ru

Выпуск подготовлен информационно-издательским отделом ИЦиГ СО РАН

Дата публикации: 15.12.2021