

Сетевое издание
Лисьма



ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основано в 2015 году
Периодичность четыре выпуска в год
DOI 10.18699/letvjgb-2024-10-21

Учредитель

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

Главный редактор

А.В. Кочетов – академик 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)

О.В. Ваулин – канд. биол. наук (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия)

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

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

Ю.Э. Гербек – канд. биол. наук (Еврейский университет в Иерусалиме, Реховот, Израиль)

И.М. Горобей – д-р с.-х. наук, профессор РАН (СО РАН, Новосибирск, Россия)

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

Ш. Демберел – академик Монгольской академии наук, профессор (Институт ветеринарной медицины, Монгольский университет естественных наук, Улан-Батор, Монголия)

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

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

А.П. Карташова – канд. с.-х. наук (Мурманская ГСХОС – филиал ВИР, Мурманск, Россия)

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

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

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

А.Ю. Лetyагин – д-р мед. наук, профессор (ИЦиГ 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, р. п. Краснообск, Новосибирская обл., 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 АН Латвии, д-р биол. наук, профессор (Институт биологии Латвийского университета, Саласпилс, Латвия)

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

А.А. Соловьев – д-р биол. наук, профессор РАН, профессор (Всероссийский центр карантина растений, 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, Красноярск, 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)

Online edition
Letters

to **VAVILOV JOURNAL
OF GENETICS AND BREEDING**

Founded in 2015
 Published four issues per year
 DOI 10.18699/letvjgb-2024-10-21

Founder

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

Editor-in-Chief

A.V. Kochetov – Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology) (ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia)

Deputy Editors-in-Chief

N.P. Goncharov – Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology) (ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia)

E.A. Salina – Professor, Dr. Sci. (Biology) (ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia)

Executive Secretary

O.Yu. Shoeva – Cand. Sci. (Biology) (ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia)

Editorial board

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

S. Demberel – Full Member of the Mongolian Academy of Sciences, Professor (Institute of Veterinary Medicine, Mongolian University of Life Sciences, Ulaanbaatar, Mongolia)

N.I. Dubovets – Corr. Member of the NAS of Belarus, Associate Professor, Dr. Sci. (Biology) (Institute of Genetics and Cytology, NASB, Minsk, Belarus)

V.S. Fishman – Cand. Sci. (Biology) (ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia)

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

I.M. Gorobei – Dr. Sci. (Biology) (Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia)

E.I. Gulyaeva – Dr. Sci. (Biology) (All-Russia Research Institute for Plant Protection, Saint Petersburg, Pushkin, Russia)

Yu.E. Herbeck – Cand. Sci. (Biology) (The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel)

A.P. Kartashova – Cand. Sci. (Agricul.) (Murmansk State Agricultural Experimental Station – Branch of the VIR, Murmansk, Russia)

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

A.M. Kudryavtsev – Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology) (Vavilov Institute of General Genetics, RAS, Moscow, Russia)

S.A. Lashin – Cand. Sci. (Biology) (ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia)

A.Y. Letyagin – Professor, Dr. Sci. (Medicine) (ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia)

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

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

A.S. Pilipenko – Cand. Sci. (Biology) (ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia)

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

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

R.R. Sadoyan – Professor, Dr. Sci. (Biology), Dean of the Faculty of Biology, Chemistry and Geography (Kh. Abovyan Armenian State Pedagogical University, Yerevan, Armenia)

S.V. Shekhovtsov – Cand. Sci. (Biology), Head of the Genogeography Sector of the Palearctic (Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia)

A.A. Soloviev – Professor, Dr. Sci. (Biology), Deputy Director (All-Russian Plant Quarantine Center, Moscow, Russia)

N.A. Surin – Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Agricul.), Professor, Head of Scientific Direction

V.A. Trifonov – Professor, Dr. Sci. (Biology) (Institute of Molecular and Cellular Biology, SB RAS, Novosibirsk, Russia)

O.V. Vaulin – Cand. Sci. (Biology) (ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia)

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

I.K. Zakharov – Professor, Dr. Sci. (Biology) (ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia)

СОДЕРЖАНИЕ • 2024 • 10 • 4

- 187 **Генетика**
Обзор
Macrostomum lignano как модельный объект
в современных исследованиях
А.М. Дмитриева, Г.Ю. Чепурнов, К.О. Плотников,
А.Г. Блинов, М.Ю. Бирюков
- 199 **Методы и протоколы**
Анализ расщеплений количественных признаков,
основанный на фундаментальных свойствах
нормального распределения
Д.В. Речкин
- 204 **Молекулярная биология**
Обзор
Принципы использования рекомбинантных
аденоассоциированных вирусов
в исследованиях и терапии
С.А. Марченко, Д.А. Ланшаков
- 216 **Обзор**
Роль метилирования m6A мРНК
в патогенезе злокачественной опухоли
В.П. Николин, Н.А. Попова, Е.Ю. Рыкова
- 224 **Биотехнология растений**
Методы и протоколы
Оптимизация параметров биобаллистики
для трансформации мягкой пшеницы
Triticum aestivum L. линии Велют
М.А. Нестеров, А.А. Киселёва, Е.М. Тимонова,
Е.М. Сергеева, Е.А. Салина

CONTENTS • 2024 • 10 • 4

- Genetics**
- 187 **Review**
Macrostomum lignano as a model object
for modern researches
A.M. Dmitrieva, G.Yu. Chepurnov, K.O. Plotnikov,
A.G. Blinov, M.Yu. Biryukov
- 199 **Methods and protocols**
Analysis of quantitative traits
segregation based on fundamental properties
of the normal distribution
D.V. Rechkin
- Molecular biology**
- 204 **Review**
Principles for using recombinant
adeno-associated viruses
in research and therapy
S.A. Marchenko, D.A. Lanshakov
- 216 **Review**
The role of m6A mRNA methylation
in the pathogenesis of a malignant tumor
V.P. Nikolin, N.A. Popova, E.Y. Rykova
- Plant biotechnology**
- 224 **Methods and protocols**
Optimization of bioballistic parameters
for transformation of common
wheat *Triticum aestivum* L. line Velut
M.A. Nesterov, A.A. Kiseleva, E.M. Timonova,
E.M. Sergeeva, E.A. Salina

 pismavavilov.ru

DOI 10.18699/letvjgb-2024-10-22

Обзор

Macrostomum lignano как модельный объект в современных исследованиях

А.М. Дмитриева¹, Г.Ю. Чепурнов ², К.О. Плотников ¹, А.Г. Блинов ¹, М.Ю. Бирюков ^{1, 3} 

Аннотация: В последние годы в список модельных организмов внесен свободноживущий плоский червь *Macrostomum lignano*, нашедший широкое применение в ряде областей научных изысканий. Его ключевая особенность, высокий потенциал к регенерации, предоставляет ему устойчивость к токсичным соединениям и онкогенам, высокую адаптивность к резким изменениям факторов окружающей среды, а также длительный срок жизни, граничащий с условным бессмертием. С другой стороны, особенности хромосомного состава генома *M. lignano*, выраженные в ряде геномных нестабильностей, вкпе с регенерацией, не переходящей в опухолевый генез, открывает широкие возможности для фундаментальных исследований противораковых терапий. Обзор посвящен разбору направлений биологических наук, где применяется или мог бы применяться *M. lignano*.

Ключевые слова: регенерация; нейрогенез; полиплоидия; геномная нестабильность; старение; *Macrostomum*; плоские черви.

Для цитирования: Дмитриева А.М., Чепурнов Г.Ю., Плотников К.О., Блинов А.Г., Бирюков М.Ю. *Macrostomum lignano* как модельный объект в современных исследованиях. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;10(4):187-198. DOI 10.18699/letvjgb-2024-10-22

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке государственного бюджетного проекта FWNR-2022-0016.

Review

Macrostomum lignano as a model object for modern researches

A.M. Dmitrieva¹, G.Yu. Chepurnov ², K.O. Plotnikov ¹, A.G. Blinov ¹, M.Yu. Biryukov ^{1, 3} 

Abstract: In recent years, the free-living flatworm *Macrostomum lignano* has been added to the list of model organisms, which has proven itself applicable in a number of research areas. Its key feature – a high potential for regeneration – provides it with resistance to toxic compounds and oncogenes, high adaptability to sudden changes in environmental factors, as well as a long life span bordering on conditional immortality. On the other hand, the peculiarities of the chromosomal composition of the *M. lignano* genome, expressed in a number of genomic instabilities, coupled with regeneration that does not turn into tumor genesis, opens up wide opportunities for fundamental research of anti-cancer therapies. This review is devoted to the analysis of the areas of biological sciences where *M. lignano* is used or could be used.

Key words: regeneration; neurogenesis; polyploidy; genome instability; aging; flatworms; *Macrostomum*.

For citation: Dmitrieva A.M., Chepurnov G.Yu., Plotnikov K.O., Blinov A.G., Biryukov M.Yu. *Macrostomum lignano* as a model object for modern researches. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;10(4):187-198. DOI 10.18699/letvjgb-2024-10-22 (in Russian)

Funding: The study was carried out with the financial support of the state budget project FWNR-2022-0016.

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 Сибирский научно-исследовательский институт растениеводства и селекции – филиал Федерального исследовательского центра Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, р.п. Краснообск, Новосибирская область, Россия
Siberian Research Institute of Plant Production and Breeding – Branch of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoobsk, Novosibirsk region, Russia

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия
Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

 biryukov@bionet.nsc.ru

© Дмитриева А.М., Чепурнов Г.Ю., Плотников К.О., Блинов А.Г., Бирюков М.Ю., 2024

Введение

В истории становления современной биологии не счесть случаев, когда отдельно взятое открытие не было бы таковым без воспроизведения на объекте, отличном от человека. Все современные стандарты фармакологии предписывают тестировать препараты на лабораторных животных, а изыскания, определяющие мишени для таких препаратов, и вовсе проводятся на различных модельных объектах. В ходе многочисленных исследований организмов-долгожителей, организмов, резистентных к различным формам онкологий, а также организмов с высокой способностью к восстановлению тканей, стало ясно, что между регенерацией и онкогенезом проходит тонкая грань равновесия, различающаяся от вида к виду. А старение в этом уравнении является точкой выхода из этого противостояния. И все же возможность сдвигать подобное равновесие в целях регенеративной медицины, продления жизни и лечения онкологий остается крайне привлекательным направлением в науке.

Способность отдельных когорт плоских червей к частичной или полной регенерации в истинном ее выражении всегда вызывала особый интерес. *Macrostomum lignano* Ladurner, Schärer, Salvenmoser, & Rieger (Ladurner et al., 2005) – представитель клады *Macrostomorpha* Doe (филогения группы на рис. 1) – один из наиболее древних таксонов плоских червей (Wudarski et al., 2020), хотя и заметно отличается от их наиболее известных представителей – планарий (*Tricladida* Lang) (Martín-Durán, Egger, 2012). Одно из основных отличий представителей рода *Macrostomum* Schmidt в целом состоит в ограниченной способности к абсолютной регенерации: в нормальных условиях они не способны восстановить голову выше середины глотки, что, с другой стороны, приводит к точной регенерации остальных тканей (Simanov et al., 2012). Организм с ограниченной способностью к регенерации, у которого получилось добиться регенерации нетипичной для всех ткани, становится весьма удачным претендентом для проведения регенеративных изысканий и регуляции тканевого геноза на уровне генома. Благодаря этим особенностям на *M. lignano* было проведено немало исследований, внесших вклад в системное знание об упомянутых выше процессах.

В обзорных статьях *M. lignano* рассматривался как потенциальный модельный объект (Mouton et al., 2009); разбирались его внешние признаки и степень консервативности *Macrostomum*-специфичных генов по отношению к генам ближайших родственных паразитических плоских червей, а также к генам человека (Устьянцев и др., 2021); демонстрировались инструменты, адаптированные для работы *M. lignano*, включая различные технологии трансгеноза (Wudarski et al., 2020), и проводилось сравнение преимуществ применения технологий трансгеноза на *M. lignano* по сравнению с другими модельными червями (Sukhikh et al., 2022). В настоящем обзоре обсуждаются актуальные исследования, выполняемые на *M. lignano*, и перспективы их будущих направлений.

Особенности рода *Macrostomum* и вида *Macrostomum lignano*

Экологическая справка

Ареал *Macrostomorpha* представляет собой прибрежные участки соленых водоемов, преимущественно океанов и морей (Ladurner et al., 2005). В отличие от своих родственников планарий, род *Macrostomum* обитает в приливной зоне, иногда пережидая в мокром песке период отлива (Wudarski et al., 2020). Таким образом, в определенном плане их можно назвать экстремофилами, поскольку в подобных условиях они адаптировались к высоким дозам солнечной радиации, в частности, проводились исследования по выживанию *M. lignano* после облучения высокими дозами ультрафиолета С, и перепадам солености среды (Wudarski et al., 2017).

Анатомические и поведенческие особенности *Macrostomum lignano*

Особи *M. lignano* обладают небольшими размерами, достигая длины до 2 мм и варьируют в диапазоне 100–200 мкм в ширину в состоянии релаксации. Строение червя *M. lignano*, отражающее наиболее заметные анатомические структуры, представлено на рис. 2.

В естественных условиях *Macrostomorpha* – хищники. Они способны проводить как активный поиск пищи, так и проявлять засадническое поведение, прикрепляясь адгезивными органами хвостовой пластины к поверхностям, захватывая проплывающую мимо взвесь водорослей и микроорганизмов. Проходя глотку, пища попадает в карманы кишечника, замкнутого слепо (Ladurner et al., 2005). Будучи первичноротыми, они опорожняют содержимое кишечника обратно через глотку, из-за чего среди остатков перевариваемой ими пищи всегда имеется фракция непереваренных организмов. В результате на выращиваемых в лабораторных условиях червях часто наблюдается употребление продуктов их пищеварения повторно.

Нервная система *M. lignano* соответствует общим представлениям о плоских червях – устроена по лестничному типу. От фронтального скопления ганглиев (так называемого мозга) отходят продольные нервные тяжи, которые связываются друг с другом вентральными тяжами. Нейронная ткань иннервирует все тело, включая пару глазков, мускульный мешок и хвостовую пластину с расположенными в ней органами, регулирует сокращения глотки и тканей кишечника. В ходе наблюдений за *M. lignano* в лабораторных условиях описан ряд поведенческих реакций. Таковыми могут считаться: круговые движения при стрессе или ином угнетении нервной системы; выбрасывание наружу верхней части глотки с кишкой при отравлении; прикрепление к поверхностям при увеличении скорости потока; а также известный для отдельных представителей пример посткоитального поведения, в ходе которого червь ртом собирает впрыскиваемую партнером сперму, избегая тем самым оплодотворения и соответствующей траты ресурсов на откладку яиц (Brand, 2023).

Половое поведение представителей рода определяется особенностями каждого отдельно взятого вида. Так, *M. lignano* представляет собой организм, имеющий обе пары гонад, однако не способный к самооплодотворению,

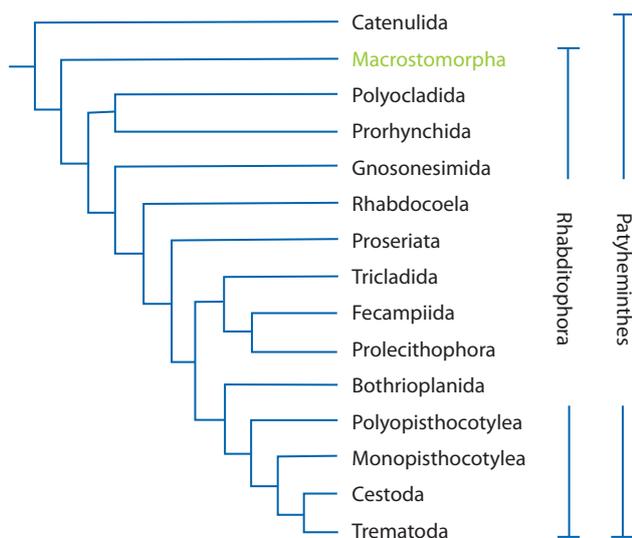


Рис. 1. Филогенетическое древо плоских червей (Platyhelminthes Gegenbaur). Клада Macrostomorpha (выделена зеленым) является базальной ветвью Rhabditophora и, соответственно, одной из наиболее древних групп плоских червей (Wudarski et al., 2020)

Fig. 1. Phylogenetic tree of flatworms (Platyhelminthes Gegenbaur). The Macrostomorpha clade (green) is a basal branch of Rhabditophora and therefore one of the most ancient flatworm group (Wudarski et al., 2020)

из-за чего половой процесс у них проходит перекрестно. В то время как другие представители рода, такие как черви *Macrostomum hystricinum* Beklemishev ssp. *marinum* Rieger, обладают более жестким стилетом и способны проткнуть не только партнера в любую часть тела, но и дотягиваются до собственной головы, делая самооплодотворение возможным (Ramm et al., 2015). После внутреннего оплодотворения, чаще всего перекрестного для обоих партнеров, яйцо непродолжительное время формируется в полости, после чего откладывается в окружающую среду. Из яйца в зависимости от температуры, которая ускоряет или замедляет метаболизм червей и их яиц, через несколько дней, обычно через 3–7 дней при ~20 °C или через 2–3 дня при ~25–30 °C (Wudarski et al., 2019), вылупляется личиночная стадия. В дальнейшем червь вырастает, отращивая себе все органы половозрелой стадии в течение двух недель, не претерпевая линьки и иных форм метаморфоза (Martín-Durán, Egger, 2012).

Способностью к регенерации *M. lignano* обязан популяции практически плюрипотентных стволовых клеток – неопластов, большую часть клетки которых занимает ядро. Численность неопластов при гомеостазе поддерживается на едином уровне, однако при утрате частей тела, как, например, при ампутациях, организму требуется небольшая минимальная численность – несколько сотен неопластов, которых обычно бывает достаточно для восстановления сначала их популяции, а затем и утраченных тканей. Считается, что немалую роль в определении недостающих тканей и клеточной судьбы дифференцирующихся неопластов определяется положением клеток и клеточными контактами, как-то подающими сигнал о клеточном окружении

(Mouton et al., 2018). В пользу этого заключения говорит системность расположения неопластов двумя тяжами вдоль всего тела и скоплениями у наиболее часто делящихся и обновляющихся тканей. Неопласты потенциально способны восстановить любую постнатальную ткань червя, однако по неокончательно выясненным причинам не способны восстанавливать голову от верхней части глотки до мозга. Причины такой неспособности остаются темой для дискуссий.

Особенности генома *Macrostomum lignano*

Размер генома оценивается приблизительно в 700 млн оснований, из которых, согласно аннотации, примерно 10 % приходится на регионы с потенциальными генными структурами, а около 50 % приходится на повторенные последовательности (Wasik et al., 2015), среди которых обнаруживаются специфичные для данного вида ретротранспозоны с длинными концевыми повторами (ДКП, или LTR ретротранспозоны) (Biryukov et al., 2020). С цитологической позиции было реконструировано, что у общего предка рода *Macrostomum* геном был представлен тремя парами малых хромосом. Затем у ряда видов произошла полногеномная дупликация, в ходе которой от слияния трех пар малых хромосом сформировалась одна большая пара. Сообщалось, что эти пары могут быть не совсем сестринскими. Возможно, именно их присутствие привело к имеющейся геномной нестабильности, в ходе которой набор хромосом меняется от восьми до десяти, а, по некоторым данным, и более десяти. Эта нестабильность числа хромосом приводит к тому, что линия, произошедшая от двух кариотипированных как $2n = 8$ червей, способна через несколько поколений породить потомство с иным кариотипом (сообщалось даже об $2n = 16$ индивидах) (Zadesenets et al., 2016, 2017, 2023). При этом черви *M. lignano* с разным числом хромосом в геномах по-прежнему свободно скрещиваются между собой давая плодовитое потомство. Однако сборка геномов, где вместо ожидаемой псевдотетраплоидности ($2n = 4x = 8$) может оказаться псевдогексаплоидный ($2n = 10$) набор хромосом или более сложным образом нарушенная его кратность, остается вызовом для каждой группы, изучающей данный вид.

Что можно моделировать на *Macrostomum lignano*?

Старение и долгожительство

На данный момент продолжают дискуссии о статусе процессов старения. В общем виде старение организма может быть сведено к совокупности нарушений, объясняемых старением отдельных тканей и/или клеток в большей степени, чем остальной организм (d'Adda di Fagagna, 2008). Когда какая-либо жизненно важная ткань, утратившая способность к поддержанию гомеостаза, не способна в достаточной мере выполнять свою функцию, в клетках такой состарившейся ткани обычно наблюдаются изменения по содержанию веществ, возведенных в ранг факторов старения. К таким факторам относят ряд соединений, неестественных или побочных продуктов работы генов, эпигенетические метки, не свойственные здоровым организмам и пр. (Jorm et al., 1998; Acosta et al., 2008; Kuilman et al., 2008; Hannum et al., 2013; Horvath, 2013; Rufini et al., 2013; McKee, Schüz, 2015). Над ролью одних спорят, может ли возникновение подобных мар-

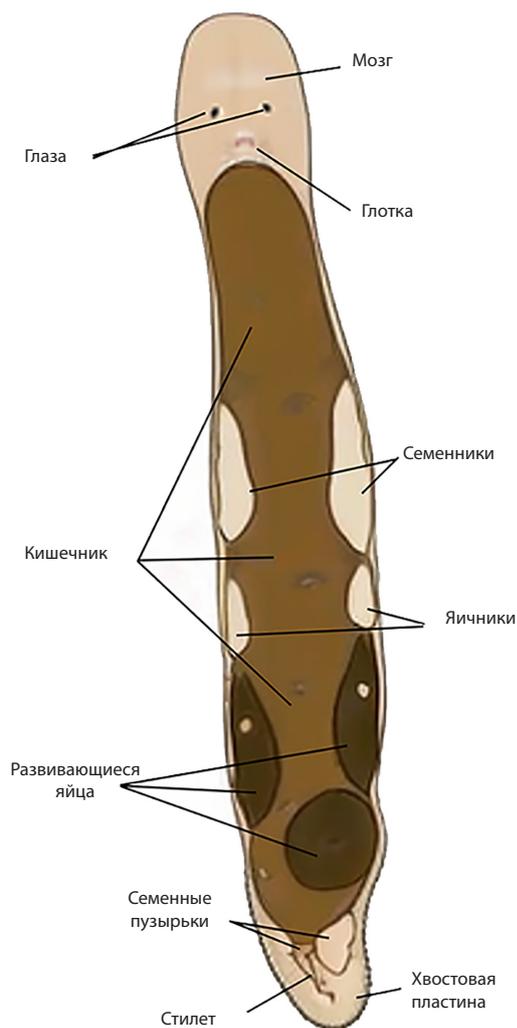


Рис. 2. Схематичное изображение наиболее крупных анатомических структур свободноживущего плоского червя *M. lignano*. Представлены: пищеварительная система (глотка и кишечник), половая (две пары гонад – семенники и яичники, развивающиеся яйца, семенные пузырьки и копулятивный орган – стилет) и частично – нервная система (глаза и мозг). Адаптировано из: (Lengerer et al., 2014)

Fig. 2. Schematic representation of the largest anatomical structures of the free-living flatworm *M. lignano*. In addition to the presented structures of the digestive (pharynx and intestines), sexual (two pairs of gonads – testes and ovaries, developing eggs, seminal vesicles and a copulatory organ – stylet), and partially represented nervous system (eyes and brain). Adapted from Lengerer et al. (2014)

кером быть причиной или следствием клеточного старения. В других случаях, таких как укорачивание теломер (Palm, de Lange, 2008), маркеры служат вполне естественным фактором клеточного старения. Так, малочисленные теломерные повторы отражают приближение клетки или клеточной популяции к пределу Хейфлика (Hayflick, Moorhead, 1961), а, следовательно, приближение к запрограммированной клеточной смерти как естественному процессу, в определенном смысле выполняющему роль противодействия старению организма и снижающему риск клеточного перерождения. И хотя был произведен ряд экспериментов по

состариванию и омоложению клеток *in vitro*, статус многих факторов старения остается не до конца понятным и, вероятно, некоторые факторы до сих пор не открыты.

Помимо отдельно выбранных маркеров не менее интересны целые сигнальные пути и баланс механизмов обратной связи, также приводящих к устойчивости к перерождению, высокой регенерации и долгожительству (Williamson et al., 2003; Kennedy et al., 2011; Tu et al., 2011; Zoncu et al., 2011; Johnson et al., 2013; Fabian et al., 2021). Поиск конкретного сигнального пути, ответственного за старение, вероятнее всего, лишен смысла, поскольку для большинства маркеров предполагается, что их роль скорее вторична, а каждый из них участвует и в других важных для клетки процессах.

Организмы, достигшие некоторых успехов в противодействии процессам старения, представляют интерес на предмет потенциальных особенностей активности у них маркеров старения. Среди наиболее примечательных групп подобных организмов, науке известен ряд условно-бессмертных организмов, таких как голые землекопы, тихоходки и некоторые другие (Buffenstein, 2005; Mouton et al., 2009; Guidetti et al., 2012; Tomczyk et al., 2015), добившиеся длительной продолжительности жизни различными путями. Где-то основная роль возлагается на работу конкретных генов и их продуктов, приводящих к более мягкой переносимости основных стрессорных факторов. Так, особая форма гиалуроновой кислоты помогает голым землекопам справляться с канцерогенами (Buffenstein, 2005). На нематод *Caenorhabditis elegans* (Maupas) Dougherty были выявлены отдельные мутации, приводящие к увеличению продолжительности жизни (Pinkston et al., 2006). Среди интересных наблюдений на этом же организме было показано, что интерференция активных мобильных элементов также увеличивала продолжительность жизни (Bessereau, 2006). Подобные случаи описаны и в работах, выполненных на других организмах.

M. lignano косвенно относится к условно-бессмертным организмам, поскольку для него в лабораторных условиях была показана продолжительность жизни более двух лет, что при двухнедельном сроке между оплодотворением яйцеклетки и до первого отложенного червем яйца говорит о весьма продолжительном пребывании во взрослом состоянии (Wudarski et al., 2020). При этом практически не наблюдалось снижение фертильности организмов, а единственными несистематическими внешними проявлениями старения были образования у отдельных особей разного рода цист, которые, однако, не выказывали агрессивной природы и зачастую не очень мешали червям питаться и размножаться. В той же работе было показано, что с возрастом в организмах *M. lignano* все же происходят регуляторные изменения, выраженные в изменении уровня экспрессии генов, которые, по всей видимости, компенсируют стандартные проявления старения. Означает ли это, что геномы могут иметь потенциальные механизмы, которые компенсируют накопительный эффект от старения или сдерживать его в достаточной мере, значительно продлевая срок жизни организма. Определенные предпосылки к этому показаны при изучении сигнальных путей, активирующих апоптоз в состаренных клетках (Kennedy et al., 2011). Но многое еще предстоит выяснить и

M. lignano может оказаться весьма удачным объектом для решения этой задачи.

Как только будет разрешена геномная нестабильность и завершена аннотация структуры генома *M. lignano*, его регуляция, можно будет моделировать взаимосвязь регуляторных процессов, чтобы определить мишени для нокадауна. Для этого уже предпринимались неоднократные попытки разделить субгеномы на цитологическом (Zadesenets et al., 2023) и биоинформатическом уровне (Wudarski et al., 2020; Zadesenets et al., 2023). Однако процесс изучения еще не завершен. После решения проблемы полиплоидии, вероятно, станут применимыми подходы, связанные с потоковыми моделями, разрабатываемыми в настоящее время преимущественно для прокариотических организмов. Они отражают процессы саморегуляции на уровне генома и его продуктов, и внесли бы неоценимый вклад в понимание того, как работают процессы, прямо или косвенно касающиеся старения и его противодействию у *M. lignano*. Как только удастся обнаружить гены-мишени, радикально меняющие продолжительность жизни подобного объекта-долгожителя, станет возможным получить червей со значительно укороченным сроком жизни после проведения нокадауна. Затем, если результаты будут воспроизведены на геномодифицированной нокаутной линии, можно будет говорить о том, что найдены гены условной бессмертности или долгожительства. За этим последует углубленное изучение каскадов, связанных с первично обнаруженными мишенями.

Таким образом, генетические и физиологические особенности *M. lignano* при должном подходе могут дать почву для новых направлений в исследовании старения человека и того, как этот процесс можно было бы сдерживать терапевтически или иными подходами.

Почему полиплоидный геном не разваливается?

Только возникшая автополиплоидизация создает перед вновьявленным организмом ряд задач, решение которых эссенциально для дальнейшего существования. Основная проблема, возникающая при полиплоидизации, – доза генов, копияность которых кратно возрастает (Qian, Zhang, 2008). Отсутствие механизмов регуляции по принципу обратной связи известно на многих примерах заболеваний, возникающих от различных форм трисомий и моносомий у человека, таких как синдром Дауна (трисомия по 21 хромосоме (Petersen, Mikkelsen, 2001)), и различные синдромы, связанные с отсутствующей (Bondy, Cheng, 2009) или избыточной (Leggett et al., 2010) половой хромосомой. Даже если предположить, что в первое время после дупликации все элементы нового субгенома сохранили свои старые механизмы регуляции, доза каждого гена в ходе его экспрессии возрастает пропорционально копияности локусов. Для некоторых генов даже такие изменения становятся критичными (Deng et al., 2004; Cahill et al., 2007; Parker, Mattos, 2018). Более того, присутствие лишней пары хромосом комплементарных друг другу может сказываться и на процессах расхождения хромосом в ходе клеточного деления, будь то митоз или каждое из делений мейоза. За нарушениями в процессе мейоза обычно следуют проблемы с созреванием гамет, и, как в следствие – снижение фертильности вплоть до абсолютной стерильности или нежизнеспособности потом-

ства как в эмбриональном, так и в раннем постнатальном периоде. Неменьшим вызовом для стабильности клетки будут и правильно настроенные эпигенетические метки – их паттерн должен сильно отличаться у ди- и тетраплоидного организмов для того, чтобы хотя бы внешне они сохраняли гомеостаз на приблизительно одном и том же уровне. Следовательно, необходимость смены паттерна эпигенетических меток становится направляющим фактором постполиплоидизационного периода адаптации генома.

Очевидно, что во всех исследованиях на *M. lignano* приходится делать поправку на сложности генома, связанные с полиплоидией. Поскольку эти черви способны сохранять гомеостаз при абсолютно немыслимой для более сложных организмов геномной нестабильности, задействованные компенсаторные механизмы могут также оказывать некоторое влияние на конкретный изучаемый процесс. Однако это может быть интересно исследователям различных видов растений, некогда тоже ставших полиплоидными (Родионов, 2013). Ключевым вопросом может стать то, что неоплоидизация у представителей рода *Macrostomum* случилась по эволюционным меркам относительно недавно, а имеющаяся геномная нестабильность все еще приводит к формированию добавочных В-хромосом и немэнделевскому наследованию больших хромосом, представляющих собой отдельную гаплоидную копию генома (Zadesenets, Rubtsov, 2021). Наблюдение за тем, как адаптация и регуляция копияности происходила и происходит в настоящее время, могут помочь понять, как процесс полиплоидизации протекал у ряда сельскохозяйственно важных культур, таких как пшеница, рожь, картофель и др. (Udall, Wendel, 2006; Renny-Bufield, Wendel, 2014). И, хотя такой полиплоидный геном уже в каком-то смысле ведет себя практически как диплоидный, этот статус по-прежнему может быть оспорен или пересмотрен.

Немалым подспорьем в этих изысканиях может послужить CRISPR/Cas9 и подобные ей технологии геномной инженерии, позволяющие весьма точно редактировать генетическую структуру и окружение потенциальных участников стабилизирующих геномную нестабильность процессов (Cui et al., 2018). С ее помощью можно нокаутировать потенциальные мишени (такowymi могут быть факторы сегрегации хромосом, регуляторы клеточного цикла или системы для эпигенетических модификаций) для создания дополнительной нестабильности. Задачей такой дестабилизации будет пронаблюдать за тем, как на это отреагирует геном, и без того вынужденный поддерживать свою стабильность на и без того сложном уровне. Установление предельных возможностей компенсации геномной нестабильности могло бы сузить область поиска ключевых особенностей, используемых червем для собственного существования.

Также остро стоит ряд вопросов о взаимосвязи между геномной нестабильностью и широкой способностью *M. lignano* к регенерации. Была ли одна следствием другой или, наоборот, нестабильность играет ключевую роль в ограниченных возможностях к регенерации головы? Известно, что некоторые организмы специально индуцируют полиплоидность для более активной реализации процессов жизнедеятельности. Может ли быть так, что нестабиль-

ность стандартного хромосомного набора ($2n = 8$), смещаемая в пользу иного числа хромосом в ядре (Zadesevets et al., 2016), возникает для лучшей работоспособности неопластов, их вариативности и, соответственно, возможности эффективно регенерировать утраченные ткани? Или же изменение числа хромосом – лишь следствие недостаточно эффективных механизмов их сегрегации при клеточном делении, возникающее как раз из-за активности постоянно делящихся неопластов? Почему при всех этих нарушениях, какова бы ни была их первичная природа, в популяциях клеток *M. lignano* не происходит перерождения и последующего канцерогенеза? Самое очевидное предположение состоит в том, что стабилизирующие геномную регуляцию *Macrostomum*-специфичные механизмы не имели необходимости эволюционировать в каком-либо дополнительном направлении, чтобы выполнять функции противодействия онкогенезу, а способствовали этому изначально. О взаимосвязи и в некотором смысле противоборстве процессов регенерации и клеточной пролиферации неоднократно сообщалось ранее на ряде организмов (Kung et al., 2010; Sugimoto et al., 2011; Alvarado, Yamanaka, 2014; Parey et al., 2024). Быть может, утрата способности к регенерации головы, известная у других групп плоских червей, в частности, планарий (Egger et al., 2006; Martín-Durán, Egger, 2012; Rink, 2013; Bertemes et al., 2020; Grosbusch et al., 2022), была ценной стабилизацией геномных нестабильностей внутри популяций, геномы представителей которых не поддерживают постоянного хромосомного набора. Ответы на эти вопросы мог бы дать анализ эволюционного развития *M. lignano*, его ближайших родственников – представителей рода *Macrostomum*, и более удаленных организмов из других групп свободноживущих плоских червей.

Возможен ли более совершенный органоогенез *in vitro*?

Помимо долгожительства и механизмов, стабилизирующих геном, *M. lignano* привлекает перспективами при исследовании направления регенеративной активности. Способность вырастить практически любую утраченную ткань, как считается, определяется в организме червя клеточным окружением неопластов (Mouton et al., 2018). Теоретически эту способность можно было бы отчасти воссоздать с использованием в качестве окружения модифицированных клеточных фидеров, которые уже применяются при выращивании клеточных культур *in vitro* (Llames et al., 2015). Возможность культивировать клеточные популяции отдельных тканей *M. lignano* на данный момент еще не достигнута, но могла бы сильно упростить современные исследования по поиску транскрипционных факторов, ответственных за дифференциацию неопластов в конкретную ткань. На данный момент подобные работы вынужденно проводятся на целых взрослых червях, из-за чего в эксперимент вносится погрешность на общее состояние и поведение модельного организма – ритмы питания, спаривания, а также иные поведенческие аспекты, способны привести к задержке эффектов нокдауна или его менее очевидным проявлением (Sekii et al., 2009; Grudniewska et al., 2016, 2018; Mouton et al., 2021; Biryukov et al., 2022). Если когда-нибудь удастся получить культивируемую популяцию неопластов *M. lignano*, ее свойства можно будет сопоставить с уже существующими линиями индуци-

рованных плюрипотентных стволовых клеток и некоторых бессмертных (преимущественно, переродившихся) линий. В дальнейшем, проводя параллели, возможно появятся идеи, что конкретно можно модифицировать в уже существующих линиях, чтобы достичь аналогичного уровня регенеративных возможностей на клетках позвоночных. Конечно, особенности регенеративных способностей *M. lignano* вряд ли позволят в полной мере воспроизвести регенеративный потенциал неопластов на других организмах, но все еще могут помочь решить сложности, с которым сталкиваются исследователи на данный момент. Так, если бы любые клетки-предшественники человеческого организма можно было бы ввести в подобное неопластам плюрипотентное состояние, это могло бы привести к научному прорыву в клонировании тканей и органов. Конечно, на данный момент уже существует серия линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) (Abraham, Weiss, 2004; Adey et al., 2013). Из них уже получается выращивать миниатюрные копии органов (Shnaider, Pristysznyuk, 2021). На данный момент предел возможностей выращивания органических структур ограничен размером выращиваемой ткани и, следовательно, ее структурой, оксигенацией, питанием, иннервацией, то есть, сопутствующими тканями, без которых выживает лишь часть клеток на периферии. Именно с этой проблемой столкнулись подходы, основанные на идее использования 3D-принтеров, печатающих каркасы для будущих органов, которые затем заселяются делящейся тканью. Если, при должном стимуле и окружении, стволовые клетки, заселяемые в подобные каркасы, смогут, подобно неопластам *M. lignano*, формировать не только целевую ткань, но и структуры клеточного окружения, включая соответствующее ткани межклеточное пространство, регенеративная медицина и трансплантология смогут перешагнуть через очередную ограничивающую область проблему.

Однако для полного понимания того, как регенерировать ту или иную ткань, необходимо использовать подходы синтетической биологии по аналогии с работами по потоковому моделированию (Kulyashov et al., 2020). Разработка рабочей геномной модели регуляторных процессов в клетках *M. lignano* необходима для более точного предсказания генов, играющих роль клеточного сигналинга и факторов дифференциации, таких как транскрипционные факторы. Конечно, не обладающие кровеносной системой организмы вряд ли смогут способствовать решению проблемы прорастания сосудов в паренхиму органов, выращенных из ИПСК, однако, вероятнее всего, дополнят представления научного сообщества о сигналинге между клеткой и ее окружением, какими триггерными сигналами они обмениваются при гомеостазе и при необходимости восполнения утраченных тканей.

Триггеры и механизмы регенерации

Известен целый ряд организмов с разным уровнем способности к регенерации – черви, аксолотли и саламандры, оболочники и морские звезды (Kung et al., 2010; Katiki et al., 2011; McCusker, Gardiner, 2011; Sugimoto et al., 2011; Wu et al., 2012; Alvarado, Yamanaka, 2014; Parey et al., 2024). Так, даже про отдельные ткани человека имелся ряд утверждений о расширенных способностях к восстановлению. В одних случаях

под этим подразумевалось способность клеток печени наращивать объем для компенсации утраченных клеток (Kung et al., 2010; Choi et al., 2013). Однако регенерацией в прямом смысле данного термина этот процесс назвать сложно. В других случаях – под регенерацией могут понимать несистемные отклонения, приводящие к восстановлению некоторых тканей у отдельно взятых особей. Например, в ходе ряда работ была показана потенциальная возможность индуцирования и формирования у млекопитающих третьего поколения зубов. Такие события сначала считались единичными исключениями, или зубы вовсе вырастали из тератом, однако после рассмотрения отдельно взятых факторов (*Usag-1*, *Cebpb*, *Runx2*) удалось стимулировать закладку листка, из которого у лабораторных мышей сформировались неполноценные зубы, напоминающие большие осколки (Takahashi et al., 2013, 2020; Mishima et al., 2021). Изучение факторов, контролируемо запускающих в норме не функционирующие процессы, сложно переоценить.

Проводить подобные работы сразу на грызунах времязатратно, а также требует больших экспериментальных выборок. Эта проблема неплохо решается небольшими более простыми в содержании организмами. Постоянно регенерирующий объект, которому не требуется слишком много времени на восстановление, отлично подходит для изучения процессов, определяющих клеточную судьбу плюрипотентной клетки, а также выявления потенциальных механизмов, обуславливающих разный уровень способностей организмов к регенерации. Сначала, несомненно, необходимо понять, какой вклад в запуск и управление регенеративными процессами вносят стандартные сигнальные пути клетки, исследованные ранее на более сложных организмах, а что привносится в процесс неизученными *Macrostomum*-специфическими сигнальными путями. Можно предположить, что в основные процессы регуляции, имеющиеся у *M. lignano*, должны хотя бы отчасти соответствовать найденным уже у более сложных представителей животного мира организмов. Воспроизведение исследований на уже изученных сигнальных путях: MAPK/ERK, mTORC1/2, PIK3CA/AKT и других (Williamson et al., 2003; Kennedy et al., 2011; Schulten et al., 2011; Zoncu et al., 2011; Johnson et al., 2013) – конечно, способно показать, какие отличия в них возникли у *M. lignano*, в особенности в свете недавнего раунда полногеномной дупликации. Однако многочисленные попытки провести эксперименты, отслеживающие изменения уровней экспрессии при различных процессах, показали активность многих ранее не исследованных генов, для части которых даже не определяется какой-либо гомологии по базам геномной онтологии (Gene Ontology, GO (The Gene Ontology Consortium et al., 2023), KEGG (Kanehisa et al., 2016) и пр.). Предполагается, что эти гены могут выполнять функции от мелких регуляторов, для новых структур, перехватывающих функциональную роль у стандартных для соответствующих процессов генов. Их изучение является отдельным вызовом, в первую очередь для морских биологов, занимающихся плоскими червями, а затем и для исследователей в области клеточной дифференциации. Как и в любом отдельно взятом организме, изучение сигнальных путей можно было бы начать с нокадауна отдельных участников

пути, например, сигнальных белков – G-ассоциированных белков, киназ и факторов транскрипции, чтобы затем наблюдать за смещением клеточного равновесия. Однако слепое отключение случайно выбранных участников пути маловероятно приведет к новым наблюдениям, в силу механизмов саморегуляции посредством обратной связи. Вместо этого, имеет смысл определить, какие из киназ или других участников пути экспрессируются на более высоком или низком уровне по сравнению с неспособными к регенерации организмами и приобрели ли они какие-либо дополнительные мишени. Подобных работ пока что не производилось, поскольку неохотно принято рассматривать не как популяцию обычных стволовых клеток, а таксон-специфичный тканевый комплекс. Изменения в сигнальных путях, которые, как предполагается, более активно задействованы у *M. lignano*, должны быть представлены в первую очередь генами, являющимися либо комплексами, воспринимающими раздражитель с поверхности или через клеточный контакты неопластов (получение стимула к регенерации) или факторами транскрипции (реакция на стимул к регенерации, приводящая к клеточной дифференциации). По результатам различных экспериментов по секвенированию РНК уже был проведен ряд исследований, определявших по уровням дифференциальной экспрессии гены, которые либо были предположительными участниками целевых процессов, либо предсказывались как косвенно вовлеченные в них. Среди опубликованных данных имеются эксперименты по возрастным категориям, регенерационному процессу, облучению жесткими дозами ультрафиолета и др (Pfister et al., 2007, 2008; De Mulder et al., 2009; Sekii et al., 2009; Zhou et al., 2015; Grudniewska et al., 2016, 2018; Wudarski et al., 2020; Brand et al., 2020; Biryukov et al., 2022).

Эволюция потенциала к регенерации

Регенерация среди плоских червей очень сильно различается между таксонами. Еще исследователи прошлых столетий показали невероятный разброс в способностях плоских червей регенерировать свое тело после повреждения (Brøndsted, 1955). Так, известны примеры практически полной неспособности регенерировать утраченные ткани, и, в противопоставление тому, ряд планарий, способных не просто восстановить каждую поврежденную или утраченную ткань, но и продолжить процесс с избыточным восстановлением, формируя различные уродства, такие как присутствие более чем одной головы на теле (Egger et al., 2006). Однако слишком широкий разброс генетических особенностей удаленных видов модельных червей не позволяет полноценно сравнивать их потенциал к регенерации, в силу сложности сделать поправки на все различия на генетическом, геномном и эпигенетическом уровнях вкуче с особенностями эволюционного развития и различиями при эмбриогенезе. Исходя из вышеописанных сложностей, первые шаги в этом направлении было бы разумно сделать на ряде близкородственных организмов в силу их лучшей сопоставимости.

Род *Macrostomum* представлен на данный момент не менее чем 145 видами, значительно варьирующими между собой по ряду признаков (Brand et al., 2022). Множественные морфологические различия в размерах и форме боль-

шинства анатомических структур, разница в хромосомном составе и плоидности, особенности брачного поведения и другие варьирующие признаки, как допускается, могли бы в своей совокупности внести погрешность в потенциалах к регенерации в пределах рода *Macrostromum*, что, однако, не было достоверно рассмотрено. В случае выявления даже незначительных отличий в регенерационном потенциале, понимание того, как незначительные изменения внутри генома и хромосомного состава могли приводить к сдвигам в процессах, возникших у общего предка, и, наиболее вероятно, регулирующихся одним и тем же набором генов, может стать отправной точкой в управлении данным процессом *in vitro*. В дальнейшем подобные результаты потенциально могли бы быть применены к трансгенным позвоночным, с перспективой применения в медицинских целях.

Регенерация у видов рода *Macrostromum* в настоящий момент исследуется преимущественно на наиболее проработанном модельном объекте – виде *M. lignano*. На нем было показано, что у этого вида, как и у большинства червей *Macrostromum*, имеется выработавшийся эволюционно предел регенеративных способностей: они не способны регенерировать большую часть головы выше верхней части глотки. Считается, что неспособность к регенерации органов головы объясняется практически полным отсутствием в ней популяции необластов, в то время как у ряда модельных планарий показана способность регенерировать голову и даже не одну (Rink, 2013). С точки зрения сравнительного анализа адаптаций это свойство можно считать полезным, поскольку предупреждает риск избыточной активации регенерационного процесса, способного формировать опухоли различного генеза. С одной стороны, это ограничение служит своего рода гарантией, что рассмотрение разброса в уровне регенерационных возможностей в пределах рода *Macrostromum* не создаст сложностей из-за каких-либо лишённых системности наблюдений. С другой же стороны, остается не менее интересным вопрос о том, как вообще черви *Macrostromorpha* в большинстве своем утратили потенциал к восстановлению нервной системы. Понимание тех отличий, что были приобретены или, наоборот, утрачены у представителей *Macrostromorpha*, которые привели к неспособности, или, наоборот, отказу от возможности регенерировать центральные нервные узлы и прилегающие к ним ткани, могли бы оказаться схожими с невысокой восстановительной активностью нейронов у позвоночных.

Предполагается, что *Macrostromorpha* все же способны хотя бы отчасти восстановить регенерационный потенциал своих родственников-планарий. Так, сообщалось, что в лабораторных условиях удалось заставить *M. lignano* восстанавливать голову (Simanov et al., 2012). Достижение подобного результата уже сыграло бы немалую роль в дальнейших исследованиях дифференциативного и регенеративного потенциалов.

Регенерация нейронов: возможно ли это?

Вопрос регенерации нервной ткани остро стоит для человечества, поскольку нейроны – наиболее сложные в восстановлении клетки, при повреждении которых необходимо не только восстановить численность, но и воспроизвести исходный порядок ветвящихся связей дендритов и аксонов в

исходном состоянии. При невозможности достичь исходного состояния, даже при полном восстановлении клеточной популяции исходные свойства, связанные с механическими движениями, памятью и иными когнитивными функциями в лучшем случае потребует повторного обучения, а в худшем, исходный функционал будет утрачен. Именно поэтому научные сотрудники столетиями бьются над рядом нейродегенеративных заболеваний.

Конечно, на таком организме, как *M. lignano*, не способном к высшим когнитивным реакциям, невозможно в полной мере воспроизвести всю сложность мозга позвоночных, однако он все еще может быть использован для исследований регенерации нервной ткани. Описан ряд поведенческих реакций червей *M. lignano* на стресс, разные формы пищевого поведения и другие (Rivera-Ingraham et al., 2013; Brand, 2023). По аналогии с человеком *M. lignano* способен восстанавливать нервные отростки поврежденных при ампутации ганглиев, и восстановлению периферических клеток нервной системы, но не ганглии, также выполняющие у данного организма функцию мозга. Конечно, с имеющейся популяцией необластов, *M. lignano* очевидно превосходит человека в силу простоты его анатомического устройства. Это, однако, не отменяет возможности наблюдать на данном модельном объекте процессы роста отростков и изменения, происходящие в них, на молекулярном уровне.

Потенциал к трансгенной модификации *M. lignano* неоднократно был продемонстрирован серией публикаций ряда исследовательских групп (Wudarski et al., 2017; Ustyantsev et al., 2021; Sukhikh et al., 2022). Ряд генетических конструкций, экспрессирующих не свойственные червю белки уже первое десятилетие используется в различных целях (от работ с генами, продукты которых выполняют сигнальные функции до эссенциально важных для реализации отдельных процессов, работы целых систем органов, поддержания численности популяции необластов и др.). Нейродегенеративные заболевания, одним из промежуточных симптомов которых становится избыточное накопление в клеточной матриксе и межклетнике различных веществ неадекватной изоформы (такие как тау-белки и бета-амилоиды при болезни Альцгеймера (Fändrich et al., 2011; Kolarova et al., 2012), белки семейства синуклеинов и другие при болезни Паркинсона (Bloem et al., 2021)), в теории, могли бы быть смоделированы на *M. lignano*, после введения, например, трансгенной конструкции, конститутивно производящей модифицированный тау-белок. Любой исход подобной модели может быть интересен научному сообществу: либо черви полученной линии, действительно, станут организмами, страдающими частичным проявлением болезни Альцгеймера; либо, если адаптивные особенности *M. lignano* позволяют ему как-либо справляться с накоплением вредоносной патологией, у исследователей может возникнуть потенциальное решение аналогичной проблемы на человеке. Таким образом, *M. lignano* может стать ценным инструментом для моделирования нейродегенеративных процессов или противодействию таковым, если адаптировать на нем ряд методик, используемых преимущественно при работе с нервной системой позвоночных.

Репродуктивная система: что может пойти не так?

Достоверно известно, что будучи носителями двух наборов гонад, черви *M. lignano* способны не только полностью регенерировать ампутированные органы полового размножения, но и способны самостоятельно их переваривать в условиях недостатка пищи (Mouton et al., 2018). Таким образом, можно считать, что репродуктивная система – наиболее часто регенерируемая в естественных условиях система. Хотя *M. lignano* является гермафродитом и принципы формирования гонад и гаплоидных половых клеток в целом регулируются общими процессами, изучение данного объекта на молекулярном, а также органном и гормональном уровнях вряд ли окажется достаточно интересными для их последующей аппроксимации на более сложно организованные организмы. Однако интересные наблюдения все еще вероятны. Так, в недавнем исследовании, имевшем цель выявить гены, активно участвующие в делении неопластов, неожиданно получены результаты, свидетельствующие о роли гена *Mlig-SKP1*, гомолога человеческого *SKP1*, при нокадауне которого черви становились временно стерильными по мужским гаметам, поскольку без участия гена сперматогенез останавливался на стадии первого редукционного деления (Biryukov et al., 2022). Параллельно гомолог человеческого *SKP1* изучался более углубленно другой группой на мышах, где было показано, что ген, помимо известной по данным GO функции в формировании комплексов центровых и SCF (комплекс из следующих основных элементов: *Skp1*, *Cullin*, *F-box protein* (Zheng et al., 2002)), также играл роль в репарации двухцепочечных разрывов, происходящих по мере созревания спермиев 1 порядка (Guan et al., 2020, 2022). В своей совокупности, эти данные говорят об *SKP1* как о потенциальном таргете для разработки мужских контрацептивов, препаратов, на данный момент не имеющих зарегистрированной на рынке марки. Подобный пример консервативности функций отдельно выбранного гена говорит в пользу возможности обнаружения иных интересных закономерностей, происходящих в репродуктивной системе червей, которые, возможно в несколько измененном виде, могут быть применимы на человеке.

Регенерация как противодействие опухолевому генезу и токсическим эффектам

Особи *M. lignano* существуют преимущественно на той точке баланса между регенерацией и бесконтрольным ростом клеточной популяции, переходящим в перерождение как отдельно выбранных клеток, так и всей разрастающейся ткани. При этом, согласно утверждениям ряда исследователей, черви *M. lignano* в естественных условиях никогда не страдают от каких-либо форм онкогенеза, за исключением искусственно индуцированного (Mouton et al., 2009; Simanov et al., 2012; Willems et al., 2015). Особая устойчивость к веществам с токсическим воздействием отмечалась ранее для многих модельных планарий, отражая связь регенеративного потенциала и общей резистентности. В экспериментах с целенаправленной индукцией процессов, приводящих к гибели червей или фенотипам, содержащим неестественные выросты и прочие проявления нарушения тканевого гомеостаза, производимых как на *M. lignano*, так и на других

регенерирующих червях, значения LD50 при пересчете на массу тела выходила значительно выше, чем таковая у экспериментальных мышей (Katiki et al., 2011; Wu et al., 2012; Rink, 2013; Ribeiro, Umbuzeiro, 2014; Stevens et al., 2017; Voura et al., 2017; Van Roten et al., 2018). Токсикологические исследования на *M. lignano* могут показаться недостаточно перспективными, однако понимание, насколько избыточная по сравнению с привычной высшим эукариотам регенерация способна аккумулировать ресурсы организма против тотальных доз вредоносных агентов, все еще может дать пищу для размышлений медицинского толка. Например, остается неясным, как червь выводит относительно летальные дозы, сохраняя и восстанавливая при этом целостность тканевой и органной структур. Также до сих пор не удалось отследить, как в клетки червей доставляется двухцепочечная РНК, в растворах которой их вымачивают для проведения нокадауна целевых генов. Как именно при такой регенерации работают механизмы, не позволяющие популяции червей страдать от онкогенеза, – пока неизвестно.

Вызывают интерес и защитные свойства червя, предположительно зависящие от регуляции неопластов на молекулярном уровне, позволяющие *M. lignano* переживать высокие дозы жесткого ультрафиолета (УФ С, 210Гр) (Wudarski et al., 2017). Механизмы подобной защиты остаются неизученными. Очевидно, что из-за особенностей своего места обитания, особи рода *Macrostomum* также приспособились к временной засухе, изменению солености среды, резкому перепаду температур (даже имеют мобильные элементы, активируемые по принципу аналогичному белкам теплового шока (Wudarski et al., 2019)) и прочим варьирующим условиям окружающей среды (Egger et al., 2006; Mouton et al., 2009). Все вышеперечисленные факторы способны вызвать серьезный стресс у многих морских организмов, отчего жизнеспособность червей *M. lignano* представляет особый интерес в процессах противодействия стрессу, делая его потенциальным объектом для исследования влияния активных форм кислорода, поскольку, как известно, окислительный стресс – один из путей клеточного ответа на стрессорные факторы.

Все перечисленные проблемы лежат в одной плоскости с вопросом о геномной стабильности *M. lignano* и особенностях механизмов, регулирующих у данных организмов репарацию ДНК, клеточный арест, своевременный апоптоз, и других.

Заключение

Баланс между геномной нестабильностью и высоким регенеративным потенциалом, наблюдаемый у *M. lignano*, приближает исследователей к пониманию тонкостей между регенерацией и клеточным перерождением. Адаптации, возникшие у данного объекта, представляют интерес для исследований в области старения, токсикологического ответа на клеточном уровне, сигналинга клетки с ее окружением, потенциала моделировать нейродегенеративные заболевания человека на упрощенной модели нервной системы, а также в разработке новых подходов к культивации клеточных культур. Таким образом, *M. lignano*, а также его ближайшие (род *Macrostomum*) и более удаленные родственники

(планарии), изучаемые как по отдельности, так и в общей совокупности, могут быть перспективным инструментом в ряде исследований в качестве модельных объектов.

Список литературы / References

- Родионов А.В. Полиплоидия и межвидовая гибридизация в эволюции цветковых растений. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013;17(4/2):916-929
[Rodionov A.V. Polyploidy and interspecific hybridization in the evolution of flowering plants. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2013;17(4/2):916-929 (in Russian)]
- Устьянцев К.В., Вавилова В.Ю., Блинов А.Г., Березиков Е.В. *Macrostomum lignano* как модельный объект для исследования генетики и геномики паразитических плоских червей. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(1):108-116. doi 10.18699/VJ21.013
[Ustyantsev K.V., Vavilova V.Y., Blinov A.G., Berezikov E.V. *Macrostomum lignano* as a model to study the genetics and genomics of parasitic flatworms. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(1):108-116. doi 10.18699/VJ21.013 (in Russian)]
- Abraham R.T., Weiss A. Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nat. Rev. Immunol.* 2004;4(4):301-308. doi 10.1038/nri1330
- Acosta J.C., O'Loughlin A., Banito A., Guijarro M.V., Augert A., Raguz S., Fumagalli M., Da Costa M., Brown C., Popov N., Takatsu Y., Melamed J., d'Adda di Fagagna F., Bernard D., Hernandez E., Gil J. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell*. 2008;133(6):1006-1018. doi 10.1016/j.cell.2008.03.038
- Adey A., Burton J.N., Kitzman J.O., Hiatt J.B., Lewis A.P., Martin B.K., Qiu R., Lee C., Shendure J. The haplotype-resolved genome and epigenome of the aneuploid HeLa cancer cell line. *Nature*. 2013;500(7461):207-211. doi 10.1038/nature12064
- Alvarado A.S., Yamanaka S. Rethinking differentiation: stem cells, regeneration, and Plasticity. *Cell*. 2014;157(1):110-119. doi 10.1016/j.cell.2014.02.041
- Bertemes P., Grosbusch A.L., Egger B. No head regeneration here: regeneration capacity and stem cell dynamics of *Theama mediterranea* (Polycladida, Platyhelminthes). *Cell Tissue Res*. 2020;379(2):301-321. doi 10.1007/s00441-019-03094-8
- Bessereau J.-L. Transposons in *C. elegans*. In: The *C. elegans* research community. WormBook, 2006;1-13. doi 10.1895/wormbook.1.70.1
- Biryukov M., Berezikov E., Ustyantsev K. Classification of LTR retrotransposons in the flatworm *Macrostomum lignano*. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;6(2):54-59. doi 10.18699/Letters2020-6-12
- Biryukov M., Dmitrieva A., Vavilova V., Ustyantsev K., Bazarova E., Sukhikh I., Berezikov E., Blinov A. Mlig-SKP1 gene is required for spermatogenesis in the flatworm *Macrostomum lignano*. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(23):15110. doi 10.3390/ijms232315110
- Bloem B.R., Okun M.S., Klein C. Parkinson's disease. *Lancet*. 2021;397(10291):2284-2303. doi 10.1016/S0140-6736(21)00218-X
- Bondy C.A., Cheng C. Monosomy for the X chromosome. *Chromosome Res*. 2009;17(5):649-658. doi 10.1007/s10577-009-9052-z
- Brand J.N. Support for a radiation of free-living flatworms in the African Great Lakes region and the description of five new *Macrostomum* species. *Front. Zool.* 2023;20(1):31. doi 10.1186/s12983-023-00509-9
- Brand J.N., Wiberg R.A.W., Pjeta R., Bertemes P., Beisel C., Ladurner P., Schärer L. RNA-Seq of three free-living flatworm species suggests rapid evolution of reproduction-related genes. *BMC Genomics*. 2020;21(1):462. doi 10.1186/s12864-020-06862-x
- Brand J.N., Viktorin G., Wiberg R.A.W., Beisel C., Schärer L. Large-scale phylogenomics of the genus *Macrostomum* (Platyhelminthes) reveals cryptic diversity and novel sexual traits. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2022;166:107296. doi 10.1016/j.ympev.2021.107296
- Brøndsted H.V. Planarian regeneration. *Biol. Rev.* 1955;30(1):65-126. doi 10.1111/j.1469-185X.1955.tb00649.x
- Buffenstein R. The naked mole-rat: A new long-living model for human aging research. *J. Gerontol. Ser. A*. 2005;60(11):1369-1377. doi 10.1093/gerona/60.11.1369
- Cahill S., Smyth P., Denning K., Flavin R., Li J., Potratz A., Guenther S.M., Henfrey R., O'Leary J.J., Sheils O. Effect of BRAFV600E mutation on transcription and post-transcriptional regulation in a papillary thyroid carcinoma model. *Mol. Cancer*. 2007;6:21. doi 10.1186/1476-4598-6-21
- Choi S.M., Kim Y., Shim J.S., Park J.T., Wang R.-H., Leach S.D., Liu J.O., Deng C., Ye Z., Jang Y.-Y. Efficient drug screening and gene correction for treating liver disease using patient-specific stem cells. *Hepatology*. 2013;57(6):2458-2468. doi 10.1002/hep.26237
- Cui Y., Xu J., Cheng M., Liao X., Peng S. Review of CRISPR/Cas9 sgRNA design tools. *Interdiscip. Sci. Comput. Life Sci.* 2018;10(2):455-465. doi 10.1007/s12539-018-0298-z
- d'Adda di Fagagna F. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat. Rev. Cancer*. 2008;8(7):512-522. doi 10.1038/nrc2440
- De Mulder K., Pfister D., Kualess G., Egger B., Salvenmoser W., Willems M., Steger J., Fauster K., Micura R., Borgonie G., Ladurner P. Stem cells are differentially regulated during development, regeneration and homeostasis in flatworms. *Dev. Biol.* 2009;334(1):198-212. doi 10.1016/j.ydbio.2009.07.019
- Deng Q., Liao R., Wu B.-L., Sun P. High intensity ras signaling induces premature senescence by activating p38 pathway in primary human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 2004;279(2):1050-1059. doi 10.1074/jbc.M308644200
- Egger B., Ladurner P., Nimeth K., Gschwentner R., Rieger R. The regeneration capacity of the flatworm *Macrostomum lignano* – on repeated regeneration, rejuvenation, and the minimal size needed for regeneration. *Dev. Genes Evol.* 2006;216(10):565-577. doi 10.1007/s00427-006-0069-4
- Fabian D.K., Fuentelba M., Dönertaş H.M., Partridge L., Thornton J.M. Functional conservation in genes and pathways linking ageing and immunity. *Immun. Ageing*. 2021;18(1):23. doi 10.1186/s12979-021-00232-1
- Fändrich M., Schmidt M., Grigorieff N. Recent progress in understanding Alzheimer's β -amyloid structures. *Trends Biochem. Sci.* 2011;36(6):338-345. doi 10.1016/j.tibs.2011.02.002
- Grosbusch A.L., Bertemes P., Kauffmann B., Gotsis C., Egger B. Do not lose your head over the unequal regeneration capacity in proleciophoran flatworms. *Biology*. 2022;11(11):1588. doi 10.3390/biology11111588
- Grudniewska M., Mouton S., Simanov D., Beltman F., Grelling M., de Mulder K., Arindarto W., Weissert P.M., van der Elst S., Berezikov E. Transcriptional signatures of somatic neoblasts and germline cells in *Macrostomum lignano*. *eLife*. 2016;5:e20607. doi 10.7554/eLife.20607
- Grudniewska M., Mouton S., Grelling M., Wolters A.H.G., Kuipers J., Giepmans B.N.G., Berezikov E. A novel flatworm-specific gene implicated in reproduction in *Macrostomum lignano*. *Sci. Rep.* 2018;8(1):3192. doi 10.1038/s41598-018-21107-4
- Guan Y., Leu N.A., Ma J., Chmátal L., Ruthel G., Bloom J.C., Lampson M.A., Schimenti J.C., Luo M., Wang P.J. SKP1 drives the prophase I to metaphase I transition during male meiosis. *Sci. Adv.* 2020;6(13):eaaz2129. doi 10.1126/sciadv.aaz2129
- Guan Y., Lin H., Leu N.A., Ruthel G., Fuchs S.Y., Busino L., Luo M., Wang P.J. SCF ubiquitin E3 ligase regulates DNA double-strand breaks in early meiotic recombination. *Nucleic Acids Res.* 2022;50(9):5129-5144. doi 10.1093/nar/gkac304
- Guidetti R., Rizzo A.M., Altiero T., Rebecchi L. What can we learn from the toughest animals of the Earth? Water bears (tardigrades) as multicellular model organisms in order to perform scientific preparations for lunar exploration. *Planet. Space Sci.* 2012;74(1):97-102. doi 10.1016/j.pss.2012.05.021
- Hannum G., Guinney J., Zhao L., Zhang L., Hughes G., Sada S., Klotzle B., Bibikova M., Fan J.-B., Gao Y., Deconde R., Chen M., Rajapakse I., Friend S., Ideker T., Zhang K. Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Mol. Cell*. 2013;49(2):359-367. doi 10.1016/j.molcel.2012.10.016
- Hayflick L., Moorhead P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 1961;25(3):585-621. doi 10.1016/0014-4827(61)90192-6
- Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol.* 2013;14(10):3156. doi 10.1186/gb-2013-14-10-r115
- Johnson S.C., Rabinovitch P.S., Kaeblerlein M. mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature*. 2013;493(7432):338-345. doi 10.1038/nature11861

- Jorm A.F., Christensen H., Henderson A.S., Jacomb P.A., Korten A.E., Mackinnon A. Factors associated with successful ageing. *Australas. J. Ageing*. 1998;17(1):31-37. doi 10.1111/j.1741-6612.1998.tb00222.x
- Kanehisa M., Sato Y., Kawashima M., Furumichi M., Tanabe M. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(D1):D457-D462. doi 10.1093/nar/gkv1070
- Katiki L.M., Ferreira J.F.S., Zajac A.M., Masler C., Lindsay D.S., Chagas A.C.S., Amarante A.F.T. *Caenorhabditis elegans* as a model to screen plant extracts and compounds as natural anthelmintics for veterinary use. *Vet. Parasitol.* 2011;182(2-4):264-268. doi 10.1016/j.vetpar.2011.05.020
- Kennedy A.L., Morton J.P., Manoharan I., Nelson D.M., Jamieson N.B., Pawlikowski J.S., McBryan T., Doyle B., McKay C., Oien K.A., Enders G.H., Zhang R., Sanson O.J., Adams P.D. Activation of the PIK3CA/AKT pathway suppresses senescence induced by an activated RAS oncogene to promote tumorigenesis. *Mol. Cell*. 2011;42(1):36-49. doi 10.1016/j.molcel.2011.02.020
- Kolarova M., García-Sierra F., Bartos A., Ricny J., Ripova D. Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease. *Int. J. Alzheimers Dis*. 2012;2012:731526. doi 10.1155/2012/731526
- Kuilman T., Michaloglou C., Vredeveld L.C.W., Douma S., van Doorn R., Desmet C.J., Aarden L.A., Mooi W.J., Peepers D.S. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell*. 2008;133(6):1019-1031. doi 10.1016/j.cell.2008.03.039
- Kulyashov M., Peltek S.E., Akberdin I.R. A genome-scale metabolic model of 2,3-butanediol production by thermophilic bacteria *Geobacillus icigianus*. *Microorganisms*. 2020;8(7):1002. doi 10.3390/microorganisms8071002
- Kung J.W.C., Currie I.S., Forbes S.J., Ross J.A. Liver development, regeneration, and carcinogenesis. *BioMed Res. Int*. 2010;2010(1):984248. doi 10.1155/2010/984248
- Ladurner P., Schärer L., Salvenmoser W., Rieger R.M. A new model organism among the lower Bilateria and the use of digital microscopy in taxonomy of meiobenthic Platyhelminthes: *Macrostomum lignano*, n. sp. (Rhabditophora, Macrostromorpha). *J. Zool. Syst. Evol. Res*. 2005;43(2):114-126. doi 10.1111/j.1439-0469.2005.00299.x
- Leggett V., Jacobs P., Nation K., Scerif G., Bishop D.V.M. Neurocognitive outcomes of individuals with a sex chromosome trisomy: XXX, XYY, or XXY: a systematic review. *Dev. Med. Child Neurol*. 2010;52(2):119-129. doi 10.1111/j.1469-8749.2009.03545.x
- Lengerer B., Pjeta R., Wunderer J., Rodrigues M., Arbore R., Schärer L., Berezikov E., Hess M.W., Pfaller K., Egger B., Obwegeser S., Salvenmoser W., Ladurner P. Biological adhesion of the flatworm *Macrostomum lignano* relies on a duo-gland system and is mediated by a cell type-specific intermediate filament protein. *Front. Zool*. 2014;11(1):12. doi 10.1186/1742-9994-11-12
- Llames S., García-Pérez E., Meana Á., Larcher F., del Río M. Feeder layer cell actions and applications. *Tissue Eng. Part B Rev*. 2015;21(4):345-353. doi 10.1089/ten.teb.2014.0547
- Martín-Durán J.M., Egger B. Developmental diversity in free-living flatworms. *EvoDevo*. 2012;3(1):7. doi 10.1186/2041-9139-3-7
- McCusker C., Gardiner D.M. The axolotl model for regeneration and aging research: A mini-review. *Gerontology*. 2011;57(6):565-571. doi 10.1159/000323761
- McKee K.J., Schüz B. Psychosocial factors in healthy ageing. *Psychol. Health*. 2015;30(6):607-626. doi 10.1080/08870446.2015.1026905
- Mishima S., Takahashi K., Kiso H., Murashima-Suginami A., Tokita Y., Jo J.-I., Uozumi R., Nambu Y., Huang B., Harada H., Komori T., Sugai M., Tabata Y., Bessho K. Local application of Usag-1 siRNA can promote tooth regeneration in Runx2-deficient mice. *Sci. Rep*. 2021;11(1):13674. doi 10.1038/s41598-021-93256-y
- Mouton S., Willems M., Braeckman B.P., Egger B., Ladurner P., Schärer L., Borgonie G. The free-living flatworm *Macrostomum lignano*: A new model organism for ageing research. *Exp. Gerontol*. 2009;44(4):243-249. doi 10.1016/j.exger.2008.11.007
- Mouton S., Wudarski J., Grudniewska M., Berezikov E. The regenerative flatworm *Macrostomum lignano*, a model organism with high experimental potential. *Int. J. Dev. Biol*. 2018;62(6-7-8):551-558. doi 10.1387/ijdb.180077eb
- Mouton S., Ustyantsev K., Beltman F., Glazenburg L., Berezikov E. TIM29 is required for enhanced stem cell activity during regeneration in the flatworm *Macrostomum lignano*. *Sci. Rep*. 2021;11(1):1166. doi 10.1038/s41598-020-80682-7
- Palm W., de Lange T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Ann. Rev. Genet*. 2008;42:301-334. doi 10.1146/annurev.genet.41.110306.130350
- Parey E., Ortega-Martinez O., Delroisse J., Piovani L., Czarkwiani A., Dylus D., Arya S., Dupont S., Thorndyke M., Larsson T., Johannesson K., Buckley K.M., Martinez P., Oliveri P., Marlétaz F. The brittle star genome illuminates the genetic basis of animal appendage regeneration. *Nat. Ecol. Evol*. 2024;8(8):1505-1521. doi 10.1038/s41559-024-02456-y
- Parker J.A., Mattos C. The K-Ras, N-Ras, and H-Ras isoforms: unique conformational preferences and implications for targeting oncogenic mutants. *Cold Spring Harb. Perspect. Med*. 2018;8(8):a031427. doi 10.1101/cshperspect.a031427
- Petersen M.B., Mikkelsen M. Nondisjunction in trisomy 21: Origin and mechanisms. *Cytogenet. Cell Genet*. 2001;91(1-4):199-203. doi 10.1159/000056844
- Pfister D., De Mulder K., Philipp I., Kualess G., Hrouda M., Eichberger P., Borgonie G., Hartenstein V., Ladurner P. The exceptional stem cell system of *Macrostomum lignano*: Screening for gene expression and studying cell proliferation by hydroxyurea treatment and irradiation. *Front. Zool*. 2007;4(1):9. doi 10.1186/1742-9994-4-9
- Pfister D., De Mulder K., Hartenstein V., Kualess G., Borgonie G., Marx F., Morris J., Ladurner P. Flatworm stem cells and the germ line: developmental and evolutionary implications of macvasa expression in *Macrostomum lignano*. *Dev. Biol*. 2008;319(1):146-159. doi 10.1016/j.ydbio.2008.02.045
- Pinkston J.M., Garigan D., Kenyon C. Mutations that increase the life span of *C. elegans* inhibit tumor growth. *Science*. 2006;313(5789):971-975. doi 10.1126/science.1121908
- Qian W., Zhang J. Gene dosage and gene duplicability. *Genetics*. 2008;179(4):2319-2324. doi 10.1534/genetics.108.090936
- Ramm S.A., Schlatter A., Poirier M., Schärer L. Hypodermic self-insemination as a reproductive assurance strategy. *Proc. Biol. Sci*. 2015;282(1811):20150660. doi 10.1098/rspb.2015.0660
- Renny-Byfield S., Wendel J.F. Doubling down on genomes: Polyploidy and crop plants. *Am. J. Bot*. 2014;101(10):1711-1725. doi 10.3732/ajb.1400119
- Ribeiro A.R., Umbuzeiro G.D.A. Effects of a textile azo dye on mortality, regeneration, and reproductive performance of the planarian, *Girardia tigrina*. *Environ. Sci. Eur*. 2014;26(1):22. doi 10.1186/s12302-014-0022-5
- Rink J.C. Stem cell systems and regeneration in planaria. *Dev. Genes Evol*. 2013;223(1):67-84. doi 10.1007/s00427-012-0426-4
- Rivera-Ingraham G.A., Bickmeyer U., Abele D. The physiological response of the marine platyhelminth *Macrostomum lignano* to different environmental oxygen concentrations. *J. Exp. Biol*. 2013;216(14):2741-2751. doi 10.1242/jeb.081984
- Rufini A., Tucci P., Celardo I., Melino G. Senescence and aging: the critical roles of p53. *Oncogene*. 2013;32(43):5129-5143. doi 10.1038/onc.2012.640
- Schulten H.J., Al-Maghrabi J., Al-Ghamdi K., Salama S., Al-Muhayawi S., Chaudhary A., Hamour O., Abuzenadah A., Gari M., Al-Qahtani M. Mutational screening of *RET*, *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *AKT1*, and *CTNNB1* in medullary thyroid carcinoma. *Anticancer Res*. 2011;31(12):4179-4183
- Sekii K., Salvenmoser W., De Mulder K., Schärer L., Ladurner P. *Melav2*, an *elav*-like gene, is essential for spermatid differentiation in the flatworm *Macrostomum lignano*. *BMC Dev. Biol*. 2009;9(1):62. doi 10.1186/1471-213X-9-62
- Shnaider T.A., Pristysznyuk I.E. CLARITY and Light-Sheet microscopy sample preparation in application to human cerebral organoids. *Vavilov J. Genet. Breed*. 2021;25(8):889-895. doi 10.18699/VJ21.103
- Simanov D., Mellaart-Straver I., Sormacheva I., Berezikov E. The flatworm *Macrostomum lignano* is a powerful model organism for ion channel and stem cell research. *Stem Cells Int*. 2012;2012(1):167265. doi 10.1155/2012/167265
- Stevens A.-S., Willems M., Plusquin M., Ploem J.-P., Winkelmanns E., Artois T., Smeets K. Stem cell proliferation patterns as an alternative for in vivo prediction and discrimination of carcinogenic compounds. *Sci. Rep*. 2017;7(1):45616. doi 10.1038/srep45616
- Sugimoto K., Gordon S.P., Meyerowitz E.M. Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just dif-

- ferentiation? *Trends Cell Biol.* 2011;21(4):212-218. doi 10.1016/j.tcb.2010.12.004
- Sukhikh I.S., Biryukov M.Y., Blinov A.G. Transgenesis in worms: candidates for an ideal model. *Mol. Biol. (Mosk.)*. 2022;56(6):983-989. doi 10.31857/S0026898422060210
- Takahashi K., Kiso H., Saito K., Togo Y., Tsukamoto H., Huang B., Bessho K. Feasibility of gene therapy for tooth regeneration by stimulation of a third dentition. In: Molina F.M. (Ed.). *Gene Therapy*. In-Tech, 2013;727-744. doi 10.5772/52529
- Takahashi K., Kiso H., Murashima-Suginami A., Tokita Y., Sugai M., Tabata Y., Bessho K. Development of tooth regenerative medicine strategies by controlling the number of teeth using targeted molecular therapy. *Inflamm. Regen.* 2020;40(1):21. doi 10.1186/s41232-020-00130-x
- The Gene Ontology Consortium; Aleksander S.A., Balhoff J., Carbon S., Cherry J.M., Drabkin H.J., Ebert D., Feuermann M., Gaudet P., Harris N.L., Hill D.P., Lee R., Mi H., Moxon S., Mungall C.J., Muruganugan A., Mushayahama T., Sternberg P.W., Thomas P.D., Van Auken K., Ramsey J., Siegele D.A., Chisholm R.L., Fey P., Aspromonte M.C., Nugnes M.V., Quaglia F., Tosatto S., Giglio M., Nadendla S., Antonazzo G., Attrill H., dos Santos G., Marygold S., Strelets V., Tabone C.J., Thurmond J., Zhou P., Ahmed S.H., Asanithong P., Luna Buitrago D., Erdol M.N., Gage M.C., Ali Kadhum M., Li K.Y.C., Long M., Michalak A., Pesala A., Pritazahra A., Saverimuttu S.C.C., Su R., Thurlow K.E., Lovering R.C., Logie C., Oliferenko S., Blake J., Christie K., Corbani L., Dolan M.E., Drabkin H.J., Hill D.P., Ni L., Sitnikov D., Smith C., Cuzick A., Seager J., Cooper L., Elser J., Jaiswal P., Gupta P., Jaiswal P., Naithani S., Lera-Ramirez M., Rutherford K., Wood V., De Pons J.L., Dwinell M.R., Hayman G.T., Kaldunski M.L., Kwitek A.E., Lauderkind S.J.F., Tutaj M.A., Vedi M., Wang S.-J., D'Eustachio P., Aimo L., Axelsen K., Bridge A., Hyka-Nouspikel N., Morgat A., Aleksander S.A., Cherry J.M., Engel S.R., Karra K., ..., Gos A., Gruaz-Gumowski N., Hulo C., Hyka-Nouspikel N., Raciti D., Jungo F., Le Mercier P., Lieberherr D., Masson P., Morgat A., Pedruzzi I., Pourcel L., Poux S., Rivoire C., Sundaram S., Bateman A., Bowler-Barnett E., Bye-A-Jee H., Denny P., Ignatchenko A., Ishtiaq R., Lock A., Lussi Y., Magrane M., Martin M.J., Orchard S., Raposo P., Speretta E., Tyagi N., Warner K., Zaru R., Diehl A.D., Lee R., Chan J., Diamantakis S., Raciti D., Zarowiecki M., Fisher M., James-Zorn C., Ponferrada V., Zorn A., Ramachandran S., Ruzicka L., Westerfield M. The Gene Ontology knowledge base in 2023. *Genetics*. 2023;224(1):iyad031. doi 10.1093/genetics/iyad031
- Tomczyk S., Fischer K., Austad S., Galliot B. Hydra, a powerful model for aging studies. *Invertebr. Reprod. Dev.* 2015;59(Suppl. 1):11-16. doi 10.1080/07924259.2014.927805
- Tu Z., Aird K.M., Bitler B.G., Nicodemus J.P., Beeharry N., Xia B., Yen T.J., Zhang R. Oncogenic Ras regulates BRIP1 expression to induce dissociation of BRCA1 from chromatin, inhibit DNA repair, and promote senescence. *Dev. Cell.* 2011;21(6):1077-1091. doi 10.1016/j.devcel.2011.10.010
- Udall J.A., Wendel J.F. Polyploidy and crop improvement. *Crop Sci.* 2006;46(51):S3-S14. doi 10.2135/cropsci2006.07.0489tpg
- Ustyantsev K., Wudarski J., Sukhikh I., Reinoite F., Mouton S., Berezikov E. Proof of principle for piggyBac-mediated transgenesis in the flatworm *Macrostomum lignano*. *Genetics*. 2021;218(3):iyab076. doi 10.1093/genetics/iyab076
- Van Roten A., Barakat A.Z.A.-Z., Wouters A., Tran T.A., Mouton S., Noben J.-P., Gentile L., Smeets K. A carcinogenic trigger to study the function of tumor suppressor genes in *Schmidtea mediterranea*. *Dis. Model. Mech.* 2018;11(9):dmm032573. doi 10.1242/dmm.032573
- Voura E.B., Montalvo M.J., Dela Roca K.T., Fisher J.M., Defamie V., Narala S.R., Khokha R., Mulligan M.E., Evans C.A. Planarians as models of cadmium-induced neoplasia provide measurable benchmarks for mechanistic studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2017;142:544-554. doi 10.1016/j.ecoenv.2017.04.044
- Wasik K., Gurtowski J., Zhou X., Ramos O.M., Delás M.J., Battistoni G., El Demerdash O., Falcatori I., Vizoso D.B., Smith A.D., Ladurner P., Schärer L., McCombie W.R., Hannon G.J., Schatz M.C. Genome and transcriptome of the regeneration-competent flatworm, *Macrostomum lignano*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015;112(40):12462-12467. doi 10.1073/pnas.1516718112
- Willems M., Stevens A.-S., Adriaens E., Plusquin M., Smeets K., Van Goethem F., Vanparys P., Janssen C., Remon J.-P. An adult stem cell proliferation assay in the flatworm model *Macrostomum lignano* to predict the carcinogenicity of compounds. *Appl. Vitro Toxicol.* 2015;1(3):213-219. doi 10.1089/aivt.2015.0011
- Williamson D., Gallagher P., Harber M., Hollon C., Trappe S. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway activation: effects of age and acute exercise on human skeletal muscle. *J. Physiol.* 2003;547(3):977-987. doi 10.1113/jphysiol.2002.036673
- Wu J.-P., Li M.-H., Chen J.-S., Lee H.-L. *In vivo* and *in vitro* metabolism of tobacco-specific nitrosamine, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), by the freshwater planarian, *Dugesia japonica*. *Chemosphere*. 2012;87(11):1341-1347. doi 10.1016/j.chemosphere.2012.02.024
- Wudarski J., Simanov D., Ustyantsev K., de Mulder K., Grelling M., Grudniewska M., Beltman F., Glazenburg L., Demircan T., Wunderer J., Qi W., Vizoso D.B., Weissert P.M., Olivieri D., Mouton S., Guryev V., Aboobaker A., Schärer L., Ladurner P., Berezikov E. Efficient transgenesis and annotated genome sequence of the regenerative flatworm model *Macrostomum lignano*. *Nat. Commun.* 2017;8(1):2120. doi 10.1038/s41467-017-02214-8
- Wudarski J., Ustyantsev K., Glazenburg L., Berezikov E. Influence of temperature on development, reproduction and regeneration in the flatworm model organism, *Macrostomum lignano*. *Zool. Lett.* 2019;5(1):7. doi 10.1186/s40851-019-0122-6
- Wudarski J., Egger B., Ramm S.A., Schärer L., Ladurner P., Zadesenets K.S., Rubtsov N.B., Mouton S., Berezikov E. The free-living flatworm *Macrostomum lignano*. *EvoDevo*. 2020;11(1):5. doi 10.1186/s13227-020-00150-1
- Zadesenets K.S., Rubtsov N.B. B chromosomes in free-living flatworms of the genus *Macrostomum* (Platyhelminthes, Macrostomorpha). *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(24):13617. doi 10.3390/ijms222413617
- Zadesenets K.S., Vizoso D.B., Schlatter A., Konopatskaia I.D., Berezikov E., Schärer L., Rubtsov N.B. Evidence for karyotype polymorphism in the free-living flatworm, *Macrostomum lignano*, a model organism for evolutionary and developmental biology. *PLoS One*. 2016;11(10):e0164915. doi 10.1371/journal.pone.0164915
- Zadesenets K.S., Schärer L., Rubtsov N.B. New insights into the karyotype evolution of the free-living flatworm *Macrostomum lignano* (Platyhelminthes, Turbellaria). *Sci. Rep.* 2017;7(1):6066. doi 10.1038/s41598-017-06498-0
- Zadesenets K.S., Ershov N.I., Bondar N.P., Rubtsov N.B. Unraveling the unusual subgenomic organization in the neopolyploid free-living flatworm *Macrostomum lignano*. *Mol. Biol. Evol.* 2023;40(12):msad250. doi 10.1093/molbev/msad250
- Zheng N., Schulman B.A., Song L., Miller J.J., Jeffrey P.D., Wang P., Chu C., Koepp D.M., Elledge S.J., Pagano M., Conaway R.C., Conaway J.W., Harper J.W., Pavletich N.P. Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F-box^{SKP2} SCF ubiquitin ligase complex. *Nature*. 2002;416(6882):703-709. doi 10.1038/416703a
- Zhou X., Battistoni G., El Demerdash O., Gurtowski J., Wunderer J., Falcatori I., Ladurner P., Schatz M.C., Hannon G.J., Wasik K.A. Dual functions of *Macpiwi1* in transposon silencing and stem cell maintenance in the flatworm *Macrostomum lignano*. *RNA*. 2015;21(11):1885-1897. doi 10.1261/rna.052456.115
- Zoncu R., Efeyan A., Sabatini D.M. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2011;12(1):21-35. doi 10.1038/nrm3025

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 02.12.2024. После доработки 20.12.2024. Принята к публикации 20.12.2024.

 pismavavilov.ru

DOI 10.18699/letvjgb-2024-10-23

Методы и протоколы

Анализ расщеплений количественных признаков, основанный на фундаментальных свойствах нормального распределения

Д.В. Речкин 

Независимый исследователь

Аннотация: Описана математическая модель расщепления, основанная на фундаментальных свойствах нормального распределения. Предложены классификация расщеплений и их соотнесение с методикой исследования, ориентированной на преимущественное использование количественных (измеряемых) признаков. Описан алгоритм последовательного разделения би- и мультимодальных выборок на отдельные группы с применением свойства симметрии нормального распределения. Представлен метод балансировки групп, повышающий точность деления исходной выборки и унифицирующий подсчет количества объектов в группах. Продемонстрирована применимость описываемого метода к сложным распределениям различного вида, обеспечивающая определение формулы расщепления для выявленных групп. Приведены сведения о доступе к исполняемому модулю и исходным текстам специально разработанного инструментального средства.

Ключевые слова: генетика количественных признаков; расщепление; математическая модель; нормальное распределение; статистика; неменделевское наследование.

Для цитирования: Речкин Д.В. Анализ расщеплений количественных признаков, основанный на фундаментальных свойствах нормального распределения. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;10(4):199-203. DOI 10.18699/letvjgb-2024-10-25

Methods and protocols

Analysis of quantitative traits segregation based on fundamental properties of the normal distribution

D.V. Rechkin 

Independent researcher

Abstract: A mathematical segregation model based on the fundamental properties of the normal distribution is described. A classification of segregations and their correlation with a research methodology oriented towards the predominant use of quantitative (measured) traits is proposed. An algorithm for sequential division of bi- and multimodal samples into separate groups is described, which uses the symmetry property of the normal distribution. A method for balancing groups is proposed, which improves the accuracy of dividing the original sample and unifies the calculation of the number of objects in groups. The applicability of the described method to complex distributions of various types is demonstrated, which ensures the determination of the segregation formula for the identified groups. Information is provided on access to the executable module and source codes of a specially developed tool.

Key words: genetics of quantitative traits; splitting; mathematical model; normal distribution; statistics; non-Mendelian inheritance.

For citation: Rechkin D.V. Analysis of quantitative traits segregation based on fundamental properties of the normal distribution. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;10(4):199-203. DOI 10.18699/letvjgb-2024-10-25 (in Russian)

 dimer@mail.ru

 Речкин Д.В., 2024

Введение

Классическая работа Грегора Иоганна Менделя (Mendel, 1865; Мендель, 1935) посвящена анализу проявляющихся в потомстве растений закономерностей, в частности расщеплений по качественным признакам (одному или нескольким). Известно, что Мендель сознательно уклонялся от изучения количественных признаков, поскольку так и не смог установить четкие критерии однозначной классификации групп расщепления. Любое измерение, выражающееся не заключением «признак присутствует – признак отсутствует», связано как с выбором надлежащей точности измерений, так и ошибками (погрешностями) собственно измерений. В свое время анализ подобных ошибок привел К.Ф. Гаусса к исследованию свойств нормального распределения (Gauss, 1821), названного позднее в честь его исключительных заслуг в этом вопросе гауссовым распределением (также распределение Гаусса, распределение Гаусса – Лапласа) (Вентцель, 1999).

В современной генетике часто появляются работы, посвященные исследованию тех или иных особенностей наследования количественных признаков (Авдеев, 2010; Гончарова и др., 2013; Белоногова, 2014; Костылев и др., 2018, 2020). Так, все авторы отмечают сложности с выделением в массиве имеющегося материала отдельных групп, характеризующихся определенными границами измеряемых признаков, позволяющих от подсчета количества объектов перейти непосредственно к анализу расщепления как в классической генетике.

Ранее сделана попытка формализации и разработки специальной программы «Полиген А» (Мережко, 2005), однако выбор платформы реализации и неясность пользовательского интерфейса ограничили сферу ее применения всего до одного-двух экземпляров. Отсутствие документации (модели, инструкций) еще менее способствовало распространению программы.

В данной работе предпринята попытка популярно изложить математические основания (модель) анализа расщеплений количественных признаков с целью сделать соответствующие идеи и инструментарий доступными для широкой аудитории генетиков и селекционеров.

Математическая модель

Базовые представления. Проявление количественных признаков в природе в большинстве случаев имеет нормальное распределение плотности вероятности, обозначаемое как распределение величины X , зависящей от математического ожидания μ и дисперсии σ^2 :

$$X \sim N(\mu, \sigma^2) \quad (1)$$

Функция распределения выглядит как

$$\Phi(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^x e^{-\frac{(t-\mu)^2}{2\sigma^2}} dt \quad (2),$$

а функция плотности вероятности – как

$$\varphi(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}} \quad (3)$$

При анализе вариации количественного признака (в простейшем случае – единственного) доля экземпляров с тем или иным значением измерения этого признака X будет пропорциональна плотности вероятности $\varphi(x)$, а гистограмма, построенная с заданной точностью измерений значений признака и нормированная до максимума функции плотности вероятности, будет повторять вид кривой ожидаемых частот (рис. 1).

Мономодальное распределение. При исследовании вариации единственного признака, определяемого через единственный количественный показатель, закономерно ожидать, что функция плотности вероятности будет представлена **мономодальной** кривой (см. рис. 1).

Бимодальное распределение. Если на такой количественный показатель оказывают влияние хотя бы два признака, для которых параметры их нормальных распределений отличаются ($X_1 \sim N(\mu_1, \sigma_1^2)$; $X_2 \sim N(\mu_2, \sigma_2^2)$; $\mu_1 \neq \mu_2$), значения суммарной вероятности определяются для несовместных событий по формуле (4), а для совместных – по формуле (5):

$$P(A \cup B) = P(A) + P(B) \quad (4)$$

$$P(A + B) = P(A) + P(B) - P(AB) \quad (5)$$

В последнем случае при анализе гистограммы значений количественного показателя очевидно, что для получения более точных результатов следует вводить поправку на совместное проявление обоих признаков. Также не нуждается в доказательстве обстоятельство, согласно которому при различных модах проявления признаков μ_A и μ_B суммарная функция плотности вероятности будет представлена **бимодальной** кривой (рис. 2).

Мультимодальное распределение и расщепление количественных признаков. Рассмотрим аспекты распределения значений количественных признаков для гипотетического аллеля G , определяющего полную высоту растения в фазе цветения.

Предположим, что для аллеля G характерно **неполное доминирование**, влияющее на прибавку высоты растения; у генотипа gg прибавка никак не выражается, для генотипа Gg составляет 25 %, а для генотипа GG – 50 %. В таком случае при наличии достаточного количества экземпляров первого поколения гибридов от скрещивания чистых линий GG и gg распределение по показателю высоты растения будет носить ярко выраженный мономодальный характер. Этого и следует ожидать, поскольку выборка образована исключительно растениями с генотипом Gg (единообразная 25 %-ная прибавка). Скрещивание F_1 гибридов между собой (как и самоопыление гибридов) в следующем поколении F_2 гибридов даст генотипы GG , Gg и gg в соотношении 1:2:1 (мы по-прежнему полагаем, что законы Менделя работают). Таким образом, четверть растений F_2 должна иметь прибавку высоты 50 %, половина – прибавку высоты 25 %, а оставшаяся четверть – стандартную высоту без прибавки.

Полученная в результате анализа гибридов F_2 гистограмма будет иметь тримодальный вид, причем площадь пика должна вдвое превышать площади пиков μ_{GG} и μ_{gg} (рис. 3). Столкнувшись с таким характером распределения гибридов F_2 по высоте, генетик может зафиксировать в качестве результатов своего исследования как неполное доминирова-

ние для аллеля G , так и характерное для него расщепление в соотношении 1:2:1.

Иная картина будет наблюдаться в случае **полного доминирования** аллеля G над аллелем g . Получив во втором поколении F_2 гибридов то же соотношение генотипов GG , Gg и gg (1:2:1), исследователь не сможет по фенотипу отличить GG от Gg , так как все они будут иметь одинаковую прибавку в росте по сравнению с gg . Соотношение количества фенотипов будет выражаться как 3:1, и соответствующая гистограмма будет иметь бимодальный вид (рис. 4), а площадь пика μ_G будет втрое больше площади пика μ_g .

Таким образом, с помощью анализа количества и характера групп, выделяемых при оценке распределения признака, можно так же надежно, как в классической модели (качественных признаков), установить характер доминирования изучаемого аллеля и формулу расщепления.

Разделение выборки на группы. Гистограмма мономодального распределения повторяет вид функции плотности вероятности, а гистограмма распределения мультимодального – вид суммы таких функций. Остается определить для набора функций $\varphi(x)$ параметры математического ожидания (моды) μ_i и дисперсии σ_i^2 .

В любом случае анализ сложного распределения следует начинать с «открытого» края (слева или справа), где отсутствует «наложение» двух соседних функций плотности вероятности. Для определенности выберем вариант «слева» (рис. 5).

Используем такой алгоритм:

1. Двигаясь по оси абсцисс (измеряемый показатель) от минимальных значений к максимальным, находим первый по порядку максимум и по соответствующему объекту исходной выборки точно определяем значение m_μ (может отличаться от значения для столбца гистограммы).
2. Выделяем все объекты со значением измеряемого показателя $m_i < m_\mu$ в отдельную выборку M .
3. Для каждого объекта этой выделенной выборки (кроме объекта с максимальным значением показателя) создаем «пару», то есть объект со значением показателя $m_i' = m_\mu + (m_\mu - m_i)$. Объединяем выборки M и M' , получая новую выборку M .
4. Вычисляем выборочную дисперсию σ_M^2 для выборки M , определяем величину стандартного отклонения σ_M как квадратный корень из величины σ_M^2 .
5. Из исходной выборки выделяем объекты, у которых $m_\mu - \sigma_M \leq m_i \leq m_\mu + \sigma_M$, в выборку M^* . Вычисляем математическое ожидание (моду) μ .
6. Полученные значения μ_{M^*} и $\sigma_{M^*}^2$ являются параметрами первого выделенного нормального распределения $X^* \sim N(\mu_{M^*}, \sigma_{M^*}^2)$.
7. Из исходной выборки удаляем объекты, вошедшие в выборку M^* , продолжаем до тех пор, пока исходная выборка не станет пустой.

Каждое последующее нормальное распределение можно анализировать, выбирая между вариантами «слева» и «справа». Результатом служит набор функций нормального распределения, сумма которых и определяет общую вариацию исходной выборки.

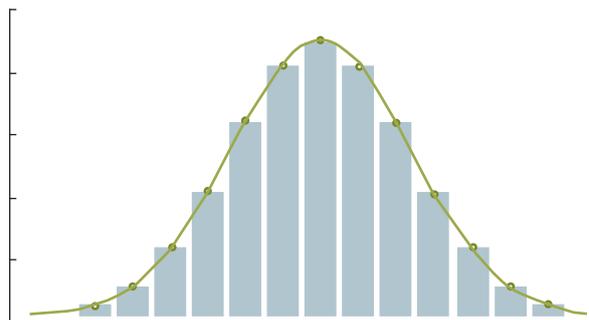


Рис. 1. Соответствие гистограммы и функции плотности нормального распределения

Fig. 1. Correspondence of the histogram and the density function of the normal distribution

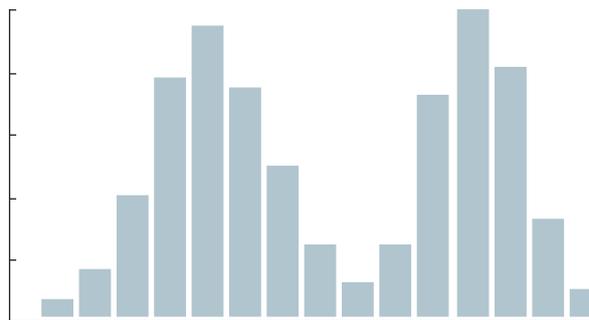


Рис. 2. Гистограмма бимодального распределения

Fig. 2. Bimodal distribution histogram sample

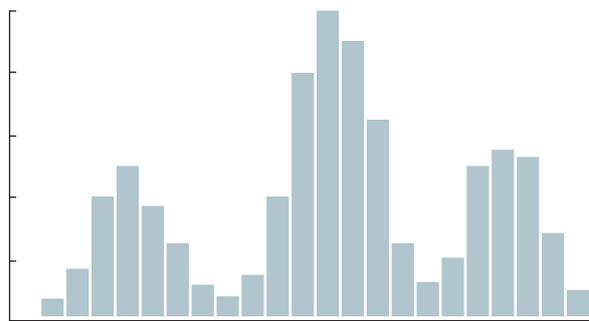


Рис. 3. Гистограмма тримодального распределения при неполном доминировании

Fig. 3. Trimodal distribution histogram sample on case of incomplete dominance

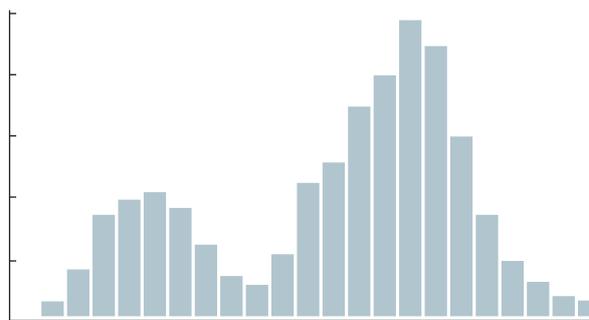


Рис. 4. Гистограмма бимодального распределения при полном доминировании

Fig. 4. Bimodal distribution histogram sample on case of complete dominance

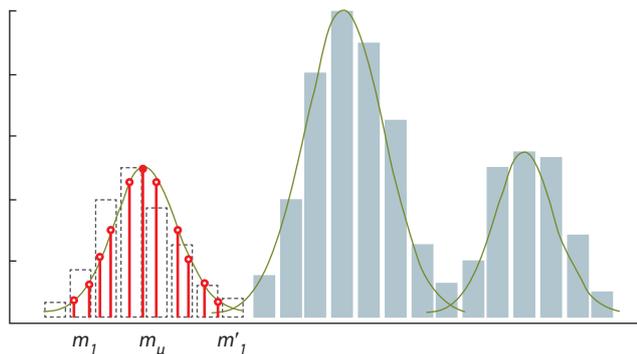


Рис. 5. Использование свойства симметрии нормального распределения

Fig. 5. Using the symmetry property of the normal distribution

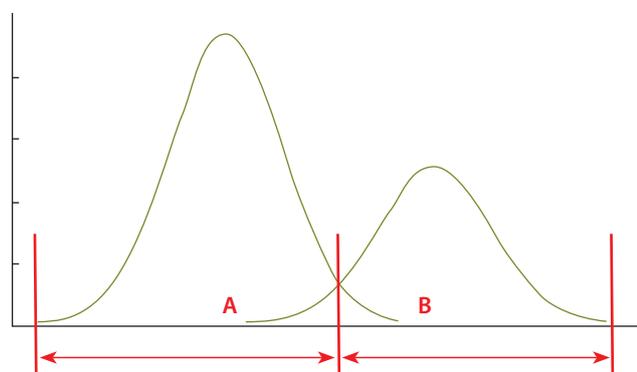


Рис. 6. Сбалансированное разделение групп

Fig. 6. Balanced division of groups

Определение границ между группами. Для всех вычисленных нормальных распределений в качестве границ (минимального и максимального значений признака для объектов, включаемых в группу) изначально применяют значения $x_{min} = \mu - 3\sigma$, $x_{max} = \mu + 3\sigma$ (правило трех сигм). Однако при таком подходе общее количество объектов, определяемое как сумма количества объектов во всех выборках, зачастую оказывается заведомо больше, чем количество объектов исходной выборки (ведь соседние распределения перекрываются, и в «зоне перекрытия» объекты считаются дважды). Поэтому следующий шаг должен приводить к сбалансированному перераспределению объектов соседних групп, чтобы избежать их вхождения более чем в одну группу.

Для разделения соседних групп находим точку пересечения соседних функций распределения, как показано на рисунке 6 (в большинстве случаев существование такой точки, притом единственной, обусловлено характером функций плотности распределения для выборок $X_1 \sim N(\mu_1, \sigma_1^2)$ и $X_2 \sim N(\mu_2, \sigma_2^2)$; $\mu_1 \neq \mu_2$ поскольку они определены на интервале $x \in (-\infty, +\infty)$). При попадании объекта точно на границу групп для определенности считаем, что он относится к «левой» группе. В исключительных случаях точка пересечения отсутствует, и тогда очевидно, что одна из выборок полностью «покрыта» другой.

Подсчет количества объектов в сбалансированных группах дает их естественное соотношение, которое легко преобразовать в искомую формулу расщепления.

Многомерные решения. В ходе исследования может выясниться, что анализируемые признаки не являются независимыми. Более того, на один и тот же количественный показатель могут влиять сразу несколько признаков. В таком случае следует собрать максимально подробные данные измерений (или иных количественных оценок проявлений изучаемых признаков) и использовать их как входные данные (исходная матрица данных) для применения метода главных компонент. В результате вычислений будут получены: (а) вектор собственных чисел, отражающий статистический вес (информативность) сформированных собственных векторов, и (б) собственные векторы, отражающие вклад каждого из исходных признаков в формирование того или иного орта (оси координат) преобразованного пространства; в этом пространстве исходные объекты могут группироваться в виде облаков рассеяния.

Для определения природы сочетаний признаков необходимо анализировать значимость главных компонент и вклады признаков в собственные векторы. Для оценки характера распределений (выделение моно-, би- и мульти-модальных распределений и их использование при генетическом анализе материала) рекомендуется применять вышеописанный метод.

Заключение

Предлагаемая методика реализована автором в программе Quantic Cat¹, имеющей удобный и наглядный (графический) интерфейс в среде Microsoft Windows, а также все необходимые средства проведения расчетов.

Исследование многомерных взаимозависимостей количественных признаков удобно проводить с помощью авторского калькулятора многомерной статистики STATIC (Речкин, 1985) в современной реализации (Jacobi-Static²). Калькулятор использует программы на языке ЯКОБИ (Ефимов, Речкин, 1985); перенос исходных данных и результатов обработки методом главных компонент существенно облегчается тем, что обе программы имеют один и тот же формат записи данных, CSV (comma-separated values).

Подсчитываемые программой Quantic Cat границы значений признака для различных групп можно соотносить с селекционной ценностью отдельных растений, входящих в ту или иную группу. При массовом отборе для последующей селекционной работы целесообразно использовать для разведения только экземпляры, обладающие значением признака, укладываемым в обозначенные границы. Такой подход позволит значительно сократить объем затрачиваемых ресурсов (материальных, людских), необходимых для селекции перспективных в хозяйственном отношении сортов и линий.

Таким образом, разработана математическая модель и реализованы программы, удовлетворяющие потребностям исследований анализа расщеплений по количественным признакам. Программы общедоступны, распространяются с открытым исходным кодом, что полностью снимает эконо-

¹ Доступно: <http://quantic-cat.sourceforge.net> (дата обращения 27 июля 2023 г.)

² Доступно: <http://sourceforge.net/projects/jacobi-static> (дата обращения 14 июня 2023 г.)

мические и юридические вопросы и создает предпосылки для их применения в исследовательской работе.

Список литературы / References

- Авдеев Ю.И. Генетический анализ количественных признаков растений (монография). *Успехи современного естествознания*. 2010;(2):87-88
[Avdeev Yu.I. Genetic analysis of quantitative traits of plants (monograph). *Advances in Current Natural Sciences*. 2010;(2):87-88 (in Russian)]
- Белоногова Н.М. «Прямая» и «обратная» генетика. Генетика количественных признаков. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2014;18(1):147-157
[Belonogova N.M. "Direct" and "reverse" genetics. Genetics of quantitative traits. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2014;18(1):147-157 (in Russian)]
- Вентцель Е.С. Теория вероятностей: Учебник для вузов, изд. 6-е, стер. М.: Высш. школа, 1999
[Wentzel E.S. Theory of Probability: Textbook for High Schools (6th ed., steryotyped). Moscow: High School Publ., 1999 (in Russian)]
- Гончарова Э.А., Шумлянская (Почепня) Н.В., Щедрина З.А. Методология анализа количественных признаков в разработке технологий создания исходного материала для селекции растений. *Овощи России*. 2013;(3):30-31
[Goncharova E.A., Shumlyanskaya (Pochepnya) N.V., Shchedrina Z.A. Methodology for the analysis of quantitative traits in the development of technologies for creating initial material for plant breeding. *Vegetable Crops of Russia*. 2013;(3):30-31 (in Russian)]
- Ефимов В.М., Речкин Д.В. ЯКОБИ – входной язык пакетов прикладных программ статистической обработки биологических данных. *Науч.-техн. бюл.* Новосибирск: ВАСХНИЛ, Сиб. отд-ние. 1985;(48):12-17
[Efimov V.M., Rechkin D.V. JACOBI - the input language of packages of applied programs for statistical processing of biological data. *Scientific and Technical Bulletin*. Novosibirsk: VASKhNIL, Siberian Department. 1985;(48):12-17 (in Russian)]
- Костылев П.И., Краснова Е.В., Аксенов А.В. Наследование ряда количественных признаков у гибрида риса Карлик 1 × LK. *Зерновое хозяйство России*. 2018;(3):43-47. DOI 10.31367/2079-8725-2018-57-3-43-47
[Kostylev P.I., Krasnova E.V., Aksenov A.V. Inheritance of a number of quantitative traits of the rice hybrid Karlik 1 × LK. *Grain Economy of Russia*. 2018;(3):43-47. DOI 10.31367/2079-8725-2018-57-3-43-47 (in Russian)]
- Костылев П.И., Краснова Е.В., Аксенов А.В., Балукова Э.С. Анализ наследования количественных признаков у гибрида риса Кубояр × Гагат. *Аграрный вестник Урала*. 2020;(11(202)):64-75. DOI 10.32417/1997-4868-2020-202-11-64-75
[Kostylev P.I., Krasnova E.V., Aksenov A.V., Balyukova E.S. Analysis of the inheritance of quantitative traits in the rice hybrid Kuboyar × Gagat. *Agrarian Bulletin of the Urals*. 2020;(11 (202)):64-75. DOI 10.32417/1997-4868-2020-202-11-64-75 (in Russian)]
- Мендель Г. Опыты над растительными гибридами. М.; Л.: ОГИЗ-Сельхозгиз, 1935;112
[Mendel G. Experiments on plant hybrids. Moscow – Leningrad: OGIZ-Selkhozgiz Publ., 1935;112 (in Russian)]
- Мережко А.Ф. Использование менделевских принципов в компьютерном анализе наследования варьирующих признаков. В: Экологическая генетика культурных растений: Материалы школы молодых ученых РАСХН. Краснодар: ВНИИ риса, 2005; 107-117
[Merezhko A.F. The use of Mendelian principles in computer analysis of the inheritance of varying traits. In: Ecological genetics of cultivated plants: Materials of the school of young scientists of the Russian Academy of Agricultural Sciences. Krasnodar: All-Russian Research Institute of Rice Publ., 2005;107-117 (in Russian)]
- Речкин Д.В. Реализация входного языка ЯКОБИ для мини-ЭВМ «Электроника-60». Пакет STATIC. *Науч.-техн. бюл.* Новосибирск: ВАСХНИЛ, Сиб. отд-ние. 1985;(48):18-24
[Rechkin D.V. Implementation of the JACOBI input language for the Elektronika-60 minicomputer. Package STATIC. *Scientific and Technical Bulletin*. Novosibirsk: VASKhNIL, Siberian Department. 1985;(48):18-24 (in Russian)]
- Gauss C.F. Theoria combinationis observationum: erroribus minimis obnoxiae. Göttingen: Societas Regia Scientiarum Gottingensis, 1821
[Gauss C.F. Theory of the combination of observations least subject to errors. Göttingen: Societas Regia Scientiarum Gottingensis, 1821 (in Latin)]
- Mendel G. Versuche über Pflanzen-Hybriden. In: Verhandlungen des naturforschenden Vereins in Brünn. IV. Band. Abhandlungen 1865. Brünn: Im Verlage des Verein, 1866;3-47

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 28.07.2023. После доработки 11.09.2023. Принята к публикации 12.09.2024.

 pismavavilov.ru

DOI 10.18699/letvjgb-2024-10-24

Обзор

Принципы использования рекомбинантных аденоассоциированных вирусов в исследованиях и терапии

С.А. Марченко ^{1,2}, Д.А. Ланшаков ^{1,2,3} 

Аннотация: Аденоассоциированные вирусы (AAV) прочно вошли в практику научных исследований в широком спектре областей, от молекулярной биологии до физиологии. Они прошли путь от открытия их как вирусов в 1965 г. до широко используемого молекулярно-биологического инструмента на сегодняшний день. Исследователей привлекает в них надежность, стабильная экспрессия трансгена и низкая иммуногенность. Часто AAV становятся привлекательным средством доставки для генотерапии. Все больше фармацевтических компаний запускают клинические испытания с использованием AAV в качестве доставки генотерапии. В 2023 г. Food and Drug Administration (FDA – Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств, США) был одобрен препарат Roctavian для лечения гемофилии А на основе AAV. Прогресс в этой области навел нас на мысль о его концептуальном обобщении и написании настоящей работы. В статье приведен анализ последних молекулярно-биологических и биотехнологических решений для аденоассоциированной вирусной доставки, а также ее оптимизации на животных моделях и способах сделать ее более направленной. Рассмотрены особенности серотипов аденоассоциированных вирусов, особое внимание уделено их тропизмам к клеткам организма и генно-инженерным способам их изменения – направленной эволюции капсидов, использованию химерных капсидов, сшитых с рецепторами или одноцепочечными антителами альлак. Существенным недостатком AAV является ограниченность кассеты – лишь 4.7 кб генного материала. В обзоре описаны приемы увеличения переносимого генетического материала и осуществления трансдукции длинных по протяженности до 10 кб последовательностей кДНК; собрана информация по проводимым клиническим испытаниям, в которых задействованы AAV, а также охарактеризованы проблемы реализации доставки генов при применении AAV в терапии.

Ключевые слова: аденоассоциированные вирусы (AAV); вирусная доставка; генная терапия; модификация капсида; клинические исследования.

Для цитирования: Марченко С.А., Ланшаков Д.А. Принципы использования рекомбинантных аденоассоциированных вирусов в исследованиях и терапии. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;10(4):204-215. DOI 10.18699/letvjgb-2024-10-24

Финансирование: Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 24-25-00154).

Review

Principles for using recombinant adeno-associated viruses in research and therapy

S.A. Marchenko ^{1,2}, D.A. Lanshakov ^{1,2,3} 

Abstract: Adeno-associated viruses (AAVs) have become an integral part of scientific research in fields ranging from molecular biology to physiology. AAV has had a remarkable evolution from being a virus in 1965 to being a stable molecular biology tool today. Researchers are attracted to their reliability, stable transgene expression and low immunogenicity. In many cases, AAV can be an attractive delivery vehicle for gene therapy. Clinical trials using AAV as a gene therapy delivery system are being initiated by an increasing number of pharmaceutical companies. FDA approves Roctavian for AAV-based treatment of hemophilia A in 2023. This progress in the field has led us to think about its conceptual generalization and the writing of this literature review. This article reviews the latest molecular biological and biotechnological solutions for adeno-associated virus delivery, its optimization in animal models, and ways to make it more targeted. The characteristics of the serotypes of adeno-associated viruses are described, with special attention to their tropisms

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

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия
Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск, Россия
Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

 lanshakov@bionet.nsc.ru

 © Марченко С.А., Ланшаков Д.А., 2024

to the cells of the body, and genetic engineering methods to modify them: directed evolution of capsids, use of chimeric capsids cross-linked with receptors or single-chain antibodies of alpacas. A major disadvantage of AAV is the limited size of the cassette – only 4.7 kb of genetic material. The review also describes techniques for increasing the amount of genetic material transferred and for performing transduction of cDNA sequences up to 10 kb in length. The review gathers information on ongoing clinical trials using AAV and also describes the challenges of implementing gene delivery when using AAV in therapy.

Key words: adeno-associated viruses (AAV); viral delivery; gene therapy; capsid modification; clinical studies.

For citation: Marchenko S.A., Lanshakov D.A. Principles for using recombinant adeno-associated viruses in research and therapy. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;10(4):204-215. DOI 10.18699/letvjgb-2024-10-24 (in Russian)

Funding: The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (project No. 24-25-00154).

Введение

На сегодняшний день генная терапия – привлекательный подход для возможности лечения многих заболеваний человека, в том числе гемофилии, болезни Паркинсона, наследственного недостатка липопротеинлипазы, миопатии Дюшена и других. Генетический материал возможно доставить в клетки при помощи электропорации, липофекции, мРНК, нуклеопротеиновых частиц, а также ленти- и аденоассоциированных вирусов. В этом обзоре мы осветили последние достижения в использовании рекомбинантных аденоассоциированных вирусов как в генетических исследованиях, так и в терапии заболеваний человека генетической природы.

Характеристики AAV и их открытие

Аденоассоциированные вирусы (AAV) – это малые безоболочечные вирусы, обладающие (+/-)-одноцепочечной ДНК (Zhou et al., 2008) в качестве генома, что является основанием для их классификации как *Dependoparvovirus* из семейства Parvoviridae. Аденоассоциированные вирусы дикого типа (дтААВ) содержат геном приблизительно 4.7 кб длиной, включающий гены *rep* (replication) и *cap* (capsid), фланкированные двумя инвертированными tandemными концевыми повторами. При этом рекомбинантные вирусы могут иметь заданную комплементарность цепи. Так, вирусы, обладающие положительно-смысловой цепью, могут участвовать в синтезе продуктов вирусной ДНК без синтеза комплементарной копии. Однако предпочтительнее использовать двуцепочечную ДНК (каждая цепь упаковывается в капсиде отдельно), поскольку она способна накапливаться в клетках в виде конкатемеров, что позволяет обеспечить экспрессию продуктов генома в дочерних клетках (Wang D. et al., 2019). Конкатемеры – последовательности ДНК, содержащие множественные повторяющиеся копии генома и белки, необходимые для поддержания их структуры.

Открытая рамка считывания *rep* кодирует ферменты, регулирующие процесс репликации, транскрипции, инкапсидации; рамка с альтернативными старт-кодонами гена *cap* кодирует белки капсида вируса: virion protein (VP1, VP2, VP3, содержание которых в капсиде составляет 1:1:10 соответственно (Johnson et al., 1971). Инвертированные tandemные повторы образуют Т-образную шпильку, обеспечивающую «правильную» пространственную структуру для репликации и упаковки генома (Issa et al., 2023). Следовательно, искусственно созданные генетические конструкции на основе векторов AAV способны нести рекомбинантный геном, соот-

ветствующий размеру генома данного вируса, и могут быть изменены с использованием различных вариантов гена *cap* для создания вирионов с необходимыми тропизмами по отношению к тканям. Рекомбинантные AAV, как и дтААВ, вызывают слабую иммунную реакцию и не патогенны. Все эти особенности AAV делают данный метод доставки векторов *in vivo* предпочтительным для генной терапии, направленной на увеличение активности того или иного гена.

Впервые AAV были выделены в 1965 г. в качестве контаминантов препаратов аденовирусов (Issa et al., 2023). Несмотря на данный факт, AAV не связаны с аденовирусами по принципу помощника или сателлита и содержатся в клетках многих организмов, представляя собой латентные инфекционные агенты, способные развивать острую фазу заболеваний при определенных условиях. О доставке гена на основе AAV впервые было сообщено в 1993 г. T.R. Flotte с коллегами добились стабильно протекающей экспрессии белка CFTR (fibrosis membrane conductance regulator) в легочной ткани кролика продолжительностью более 6 месяцев (Flotte et al., 1993).

Данная группа вирусов может распознаваться рецепторами клеток и проникать в везикулах в цитоплазматическое пространство, транспортироваться через ядерные поры и, далее, обеспечивать встраивание вируса в геном путем гомологичной рекомбинации (большинство случаев); негомологичного спаривания концов (NHEJ, non-homologous end joining) в места двуцепочечных разрывов ДНК, находящиеся, как правило, в локусах сателлитных повторов, рДНК, ГЦ-обогащенных участков; сайт-специфичной интеграции в локус генома человека 19q13.2-13.4qtr (*rep*-регион) (Bijlani et al., 2022). В последнем случае вирус встраивает ДНК в AAVS1 (AAV integration site 1) локус, который обладает сайтом концевого разрешения (terminal resolution site). На данном сайте вирусные белки Rep68/78 образуют одноцепочечный разрыв, который позволяет встраиваться вирусной одноцепочечной ДНК (Bijlani et al., 2022). Сайт Rep инициирует активацию синтеза ДНК на локусе AAVS1 и формирует интеграционный комплекс между AAV ДНК и AAVS1 (Hamilton et al., 2004).

дтААВ, находясь в кариоплазме, формируют конкатемеры, не требуют вируса-помощника (за исключением серотипа 5), однако использование многих векторов предполагает наличие вспомогательных последовательностей для успешного клонирования. В каждом конкретном случае выбор одного из методов вставки генома вируса в геном клетки хозяина зависит от ряда факторов, таких как наличие зна-

чимого числа двуцепочечных разрывов, последовательностей, комплементарных ДНК вируса, специфичных сайтов узнавания и прочих. Однако ААВ способны не только трансдуцировать геном в составе хромосом клетки-хозяина, но и реплицировать его в виде конкатемеров в кариоплазме. Так, например, для гепатоцитов характерна именно внехромосомная экспрессия векторной ДНК (свыше 90 % копий) (Nakai et al., 2001).

ААВ-доставка имеет значительный ряд достоинств, что делает ее одной из часто используемых наряду с другими способами доставки. К достоинствам относятся стабильная репликация внутри генома клетки и стабильность сохранения самой вирусной частицы (Greig et al., 2024). Частицы ААВ характеризуются широким тропизмом к тканям, клеткам и клеточным линиям, что делает возможными исследования доставки генов в самые разные линии клеток, в том числе в рамках одной линии рекомбинантных ААВ (Bijlani et al., 2022). В отличие, например, от онкоретровирусов (Segura et al., 2006), инфицирующих только делящиеся клетки, ААВ инфицируют как делящиеся, так и неделящиеся клетки (Pham et al., 2024). В большинстве случаев ААВ обладают относительно малой иммуногенностью при условии правильной оптимизации, как будет показано ниже.

Несмотря на наличие многих преимуществ, ААВ-доставка не лишена и недостатков, основными из которых являются: генерация нереплицирующихся ДНК-векторов в потенциальных клетках (при внехромосомном варианте трансдукции в потенциальную клетку (Nakai et al., 2001)), что приводит к размножению их дефектных копий со снижением терапевтического эффекта (He et al., 2021); ограничения по длине встраиваемого вектора (до 4.7 кб для дтААВ2 или до 5.2 кб для ряда искусственных векторных конструкций (Bennett et al., 2017); иммунологические реакции на данный вирус, что связано с наличием специфичных антител, внутриклеточных механизмов реакции на чужеродную ДНК, системы комплемента и механизмов иммунной памяти (Wang J.-H. et al., 2024).

Серотипы ААВ и их особенности

Вирусы обычно подразделяют по антигенной структуре, определяемой иммунологическими методами, называемой серотипом. На сегодняшний день идентифицировано 13 серотипов дтААВ. От серотипа и, следовательно, от специфичности вируса к распознаванию клеточными рецепторами зависит его тропизм по отношению к разным органам и тканям. Есть и множество других характеристик, отличающих серотипы ААВ: посттрансляционные модификации при сборке вируса в клетке, диапазоны хозяев, размеры капсидов, особенности функционирования генома при сборке вирусов и другие. Тропизм к ЦНС проявляют ААВ серотипов 1, 2, 4, 5, 7, 9, 10 и 11 (табл. 1).

Последовательности вирусных векторов для осуществления экспрессии и ее специфичности

Вектор ААВ должен содержать: последовательности инвертированных tandemных повторов, одноцепочечный вирусный геном, гомологичные плечи, комплементарные целевым геномным последовательностям. Димерные и са-

мокоплементарные геномы ААВ не способны к успешному введению функционального вектора в клетку, поскольку не образуют петлю гомологичной рекомбинации. Для осуществления экспрессии в вирусных ленти- и ААВ-векторах должны присутствовать специальные последовательности (промоторы) для запуска транскрипции, сайты полиаденилирования для обеспечения стабильности матричной РНК, последовательности Козак для инициации трансляции. Также могут присутствовать посттранскрипционные регуляторные элементы. Обычно используются цис-регуляторные элементы вируса гепатита В (Hepatitis B Virus PRE, 533 п. н.) и вируса гепатита сурка (Woodchuck Hepatitis Virus PRE, 600 п. н.), которые необходимы для экспорта без интронной вирусной РНК из ядра (Powell et al., 2015). Существуют и альтернативные точки зрения на механизмы действия WPRE, например, что этот вирус в большей степени терминирует сквозную транскрипцию при производстве лентивирусов, повышает титр и экспрессию (Higashimoto et al., 2007).

Присутствие данных последовательностей в РНК увеличивает экспрессию трансгена примерно в 6 и 8 раз соответственно в большинстве случаев, но эффект может зависеть от типа клеток и быть совсем незначительным. Часто сразу после промотора ставят интронную последовательность, которая увеличивает процессинг мРНК и экспрессию трансгена примерно в 1.6 раза (Powell et al., 2015). Однако некоторые авторы отмечают отсутствие доказательств воздействия регуляторных элементов на процесс экспорта мРНК из ядра (Hollensen et al., 2017). Они считают, что связывание TuD (RNA polymerase II-transcribed tough decoy, ингибиторы микроРНК) с микроРНК активизирует механизмы тримминга (trimming) или добавления 3'-конца (tailing), обеспечивающие деградацию малых РНК-транскриптов, не оказывая влияния на экспорт из ядра малых РНК. Кроме того, T. Higashimoto с коллегами (2007) отметили шестикратное увеличение скорости экспрессии гена β-галактозидазы при только двукратном повышении содержания продукта в цитоплазме в присутствии WPRE.

Тканевая специфичность экспрессии трансгена может быть обеспечена как тропизмом капсида к трансдукции определенного типа клеток, так и тканеспецифичностью промотора. Промоторы, обеспечивающие экспрессию трансгенов специфично в нейронах, даже у ААВ1 и ААВ2 (вирусов 1- и 2-го серотипа соответственно), часто используются в исследованиях с применением оптогенетических (Lanshakov et al., 2017 a, b) и хемогенетических (Dygalo et al., 2020) методов. Максимальный размер упакованного в ААВ генетического материала дает ограничения на все используемые технические последовательности, в том числе и промоторы, их размер в основном варьируется от 200 до 1500 п. н.

Синтетические промоторы на основе регуляторных последовательностей генов домашнего хозяйства, таких как *Pgk*, *Ubc*, *Gusb*, обеспечивают повсеместную экспрессию. В этом обзоре мы более подробно остановимся на промоторах, работающих в нервной ткани. Наиболее популярными промоторами, обеспечивающими экспрессию в нейронах, являются синапсиновый (*Syn*), кальций/кальмодулин-зависимой киназы II (*CamkII*), промотор *MeCP2*. Г. Фишелл с коллегами разработали промотор, активный в интернейронах

Таблица 1. Характеристика известных серотипов аденоассоциированных вирусов
Table 1. Characteristics of known serotypes of adeno-associated viruses

Серотип	Посттрансляционные модификации	Рецептор	Тропизм к органам и тканям	Уникальные особенности
AAB1	–	Рецептор сиаловой кислоты; AAB рецептор (AAVR)	Скелетные мышцы, нейроны, глиальные клетки, эндодимальные клетки, сетчатка, эндотелиальные и сосудистые гладкие мышцы, сердце у мышей	–
AAB2	Множественные: убиквитинирование, фосфорилирование, SUMOилирование, гликозилирование множественных сайтов	Человеческий рецептор фактора роста фибробластов 1 (FGFR1); $\alpha V\beta 5$, $\alpha 5\beta 1$ интегрин; рецептор фактора роста гепатоцитов (HGFR); рецептор ламинина (LR); CD9	Ткани почек; гепатоциты; ткани сетчатки; клетки ЦНС; скелетные мышцы	Вектор данного вируса может быть помещен в капсид иного серотипа (1, 4, 5, 10 и 11) (Rabinowitz et al., 2002)
AAB3	Ацетилирование, фосфорилирование, гликозилирование	HSPG; FGFR1; LR; человеческий HGFR	Гепатоциты; опухолевые клетки печени человека; внутренние волосковые клетки улитки у мышей	–
AAB4	Убиквитинирование	α -2,3-О-связанная сиаловая кислота	ЦНС и эндодимальные клетки; почки, легкие, сердце у мышей	–
AAB5	Множественные: убиквитинирование, фосфорилирование, SUMOилирование, гликозилирование	Сиаловая кислота; рецепторы фактора роста тромбоцитов (PDGFR): корецепторы α и β	Множество типов нейрональных клеток: клетки Пуркинью; звездчатые, корзинчатые клетки и нейроны Гольджи; клетки нижнего холмика и желудочкового эпителия; эпителий дыхательных путей; эндотелиальные клетки сосудов; гладкие мышцы	Требуется вирус простого герпеса (HSV) в качестве помощника; синтез полиаденилированного сайта в определенном локусе на основе регуляции активации промоторов генома вируса при помощи U1 (Qiu, Pintel, 2004)
AAB6	Ацетилирование	Сиалированные протеогликаны ($\alpha 2,3$ -/ $\alpha 2,6$ -связанная сиаловая кислота); рецептор фактора роста эпидермиса (EGFR)	Эпителий дыхательных путей, гепатоциты, скелетные мышцы, кардиомиоциты у мышей	–
AAB7	Множественные: гликозилирование, преимущественно с фосфорилированием, SUMOилирование, ацетилирование	–	Ткань коры головного мозга; ткань спинного мозга; сетчатка; гепатоциты	–
AAB8	Фосфорилирование, гликозилирование, ацетилирование	LR	Высокий тропизм к гепатоцитам у мышей, собак, нечеловекообразных обезьян; клетки поджелудочной железы, клетки канальцев и ткань почек, сетчатка у мышей	–
AAB9	Множественные: гликозилирование, фосфорилирование, SUMOилирование совместно с ацетилированием	Концевая N-связанная галактоза; интегрин с корецептором LR	Широкий спектр нейрональных и ненейрональных клеток ЦНС (астроциты, клетки сетчатки)	Высокая проницаемость через ГЭБ
AAB10	Множественные: гликозилирование и фосфорилирование совместно с убиквитинированием, SUMOилированием, ацетилированием	–	Клетки толстого и тонкого кишечника; гепатоциты, лимфоузлы, клетки почек и семенников у нечеловекообразных обезьян; клетки пигментированного эпителия сетчатки, ганглионарного слоя, фоторецепторы, горизонтальные клетки у мышей	Тропизм к клеткам сетчатки и другим типам клеток ЦНС, не характерным для AAB9

Окончание табл. 1
Table 1 (end)

Серотип	Посттрансляционные модификации	Рецептор	Тропизм к органам и тканям	Уникальные особенности
AAB11	–	GPR108 (по принадлежности к кладе AAV4) (Han et al., 2023)	Клетки кишечника, гепатоциты, лимфоузлы, клетки почек и семенников у нечеловекообразных обезьян; кора головного мозга и спинной мозг; проекторные нейроны и астроциты у мышей	–
AAB12	–	–	Слюнные железы и мышцы, эпителий носоглотки у мышей	–
AAB13	–	HSPG (Srivastava, 2016)	Малые ядра мозга (нейроны) (Han et al., 2022)	–

на основе промотора гена *Dlx* (Dimidschstein et al., 2016). Также показаны синтетические промоторы, специфичные для серотонинергических (Drozd, Lanshakov, 2020; Drozd et al., 2023) и норадренергических нейронов (Lanshakov, Sukhareva, 2020).

Экспрессия в остальных клетках нервной системы в большинстве работ обеспечивается благодаря промоторам: GFAP – для астроцитов, MBP – для олигодендроцитов. Для таргетирования на развивающиеся популяции клеток в ЦНС используются промоторы: SOX2 – для нейрональных предшественников и Olig2 – для предшественников олигодендроцитов (табл. 2).

Направленная молекулярная эволюция капсидов. Стратегии изменения тропизма

Как видно из табл. 1, капсиды серотипов AAB могут иметь тропизмы к достаточно широкому спектру тканей и клеток. Однако для достижения терапевтического эффекта часто требуется доставка в строго определенные типы клеток. Для реализации этой задачи применяют обычно два подхода: рациональный дизайн капсидов либо направленную эволюцию вирусных капсидов. Рациональный дизайн предполагает создание структурных модификаций в локализации специфических сайтов капсида на основе его структуры и биологических особенностей (Wang J.-H. et al., 2024). Рациональный дизайн осуществляется следующими способами: генетическими мутациями; инсерцией невирусных доменов в капсидные белки для изменения тропизма к тканям (объединение с рецепторами и одноцепочечными антителами); химическими модификациями.

Например, замена остатков тирозина и треонина на поверхности капсида в специфичных сайтах на фенилаланин и валин предотвращает деградацию соответствующих белков в цитоплазме клетки и увеличивает вероятность транспортировки вирусных частиц в ядро (Kanaan et al., 2017). В то же время полипептид, состоящий из 15 аминокислотных остатков и являющийся мишенью рецептора лютеинизирующего гормона (LH-R), способен при его инсерции в целевые сайты белков (VP1-3) капсида AAB повышать эффективность трансдукции целевого гена (в данном случае *lacZ*) в клетки яичников (OVCAR-3) и HeLa (Shi et al., 2001).

Существуют и иные способы повышения трансдукции вирусных частиц в клетки определенных тканей. В работе (Eichhoff et al., 2019) рассматриваются варианты объединения VP1 AAB2 с антителами альпак (VN-домена Ig, так называемые nanobody) с клеточноспецифичными белками (ARTC2.2, гликозилфосфатидилинозитол (GPI)-связанный эктоэнзим T-клеток (АДФ-рибозилтрансфераза) (Rissiek et al., 2018); CD38, трансмембранный и внутриклеточный белок (АДФ-рибозилциклаза и циклоADPR-гидролаза) большого разнообразия иммунных клеток (Piedra-Quintero et al., 2020); P2X7, лиганд-зависимый (внеклеточный АТФ) катионный канал широкого спектра клеток, в том числе иммунных, нейральных и глиальных, эндотелиальных и мышечных (Shokoples et al., 2021).

Эти белки играют роль факторов обеспечения отбора вирусных частиц по их тропизму к рецепторам соответствующих клеток. Встраивание VN-домена антитела происходило в GH2/GH3 поверхностную петлю VP1. В результате было обнаружено, что трансдукция генетических конструкций успешно осуществляется в клетки В-клеточной лимфомы человека CA46 (эндогенно экспрессирующие CD38); Т-клеточной лимфомы мыши Yac-1 (эндогенно экспрессирующие P2X7) при использовании вирусных частиц с капсидами AAB8, 9 и 1P5 (синтезирован с применением промотора P5), содержащих VN-домены антител (Eichhoff et al., 2019).

Примером химической модификации может служить модификация гуанидиновых остатков на поверхности капсида с участием метилглиоксаля с получением гидроимидазолоновых производных. Данная модификация приводит к снижению тропизма к тканям печени и повышению тропизма к нейрональным клеткам ЦНС (Horowitz et al., 2011).

Направленная эволюция вирусных капсидов заключается в обеспечении условий мутационной изменчивости вирусных частиц при помощи рандомизированной генерации химерных капсидов (Wang D. et al., 2019) с их отбором по целевым характеристикам, например, путем инкубации с раствором очищенных человеческих иммуноглобулинов против определенных серотипов вирусных химерных капсидов (AAB2, AAB8, AAB9) с последующим отбором их посредством амплификации в гепатоцитах. Это необходимо

Таблица 2. Сравнение общеиспользуемых промоторов, применяемых в векторах аденоассоциированных вирусов
Table 2. Comparison of the commonly used promoters, which are applied in adeno-associated viral vectors

Промотор	Тканеспецифичность	Относительная «сила»	Размер (п. н.)	Литературный источник
CMV	Универсальный	+++	750–800	Xu et al., 2001
СВА (включая производные: CAG, CBh и др.)	Универсальный	+	248–1600	Gray et al., 2011
EF-1a	Универсальный	+	2500	Gilham et al., 2010
PGK	Универсальный	++	426	Gilham et al., 2010
UBC	Универсальный	+	403	Qin et al., 2010
GUSB (hGBp)	Универсальный	+	378	Husain et al., 2009
UCOE (промотор IINRPA2B1-CBX3)	Универсальный	++	600–2500	Antonioni et al., 2013
hAAT	Печень	++	347–1500	Cunningham et al., 2008
TBG	Печень	++	400	Yan et al., 2012
Десмин	Скелетные мышцы	+++	1700	Talbot et al., 2010
МСК	Скелетные мышцы	++	595–1089	Katwal et al., 2013
C5-12	Скелетные, сердечные и диафрагмальные мышцы	++	312	Wang B. et al., 2008
NSE	Нейроны	+++	300–2200	Xu et al., 2001
Синапсин	Нейроны	+	470	Kuroda et al., 2008
PDGF	Нейроны	+++	1400	Hioki et al., 2007
МесP2	Нейроны	+	229	Gray et al., 2011
CaMKII	Нейроны	++	364–2300	Kuroda et al., 2008
mGluR2	Нейроны	+	1400	Kuroda et al., 2008
NFL	Нейроны	+	650	Xu et al., 2001
NFH	Нейроны	+	920	Xu et al., 2001
np2	Нейроны	+	650	Xu et al., 2001
PPE	Нейроны	+	2700	Xu et al., 2001
Enk	Нейроны	+	412	Xu et al., 2001
EAAT2	Нейроны и астроциты	++	966	Kuroda et al., 2008
GFAP	Астроциты	+	681–2200	Dirren et al., 2014
MBP	Олигодендроциты	++	1900	Chen et al., 1998

Примечание. Тканеспецифичность, относительная экспрессивность (+ наиболее низкая, +++ наиболее высокая среди приведенных); размер и соответствующие ссылки приведены для общеиспользуемых промоторов.

Note. Tissue specificity, relative expressivity (+ is the lowest, +++ is the highest among those listed); size, and relevant references are given for commonly used promoters.

для снижения иммуногенности вируса и повышения его тропизма к клеткам печени (Grimm et al., 2008).

Иногда отдельно выделяют также эволюцию капсидов *in silico*, т. е. детальное компьютерное моделирование капсидов и получаемых измененных вариантов. Так, E. Zinn с коллегами (2015) выделили наиболее вероятного предка функционально значимых серотипов AAV (AAV1, 2, 8 и 9) как часто используемых в клинических экспериментах. Кроме того, выбранный кандидат был филогенетически близок к представителям *Dependoviridae*, что позволяло предположить его применимость к исследованиям на приматах. Было продемонстрировано сопоставимое качество доставки генов в клетки печени и селезенки с помощью AAV8. Эта работа показывает применимость эволюционного анализа для установления структурно-функциональной схожести серотипов вирусов, в том числе искусственно синтезированных.

Один из распространенных способов создания вирусных библиотек для последующего отбора необходимых

по свойствам вирусных линий – химеризация имеющихся генетических конструкций (в частности, генов *rep* и *cap*). Данному методу посвящена работа (Koerber et al., 2008) по получению вирусов с заданным тропизмом к клеткам. Генерация осуществлялась методом перетасовки ДНК (DNA shuffling), который заключается в разделении ДНК (заданного участка или гена) на фрагменты, их очистке и, далее, соединении разных фрагментов ДНК данного участка методом ПЦР без использования праймеров (Stemmer, 1994). Так, при соединении генов *rep*, полученных от разных серотипов вируса, можно добиться создания химерного капсида. Затем указанные химерные вирусные частицы трансфицируются в AAV-компетентные клетки (например, в AAV293 – клетки эмбриональной почки человека), после чего созданными вирусными частицами обрабатываются клеточные линии с нужными исследователю свойствами и оценивается уровень трансдукции вектора в данные клетки (Koerber et al., 2008). D.G.R. Tervo с коллегами (2016) получили химерные

капсиды серотипов AAV (AAB1, 2, 4, 5, 6, 8, 9) с применением метода генетической перетасовки, варианты гена *cap* AAB2 со случайными вставками петель и определенных локусов. Данные рекомбинантные копии вирусных частиц отбирались для осуществления ретроградного нейронального транспорта генов и, соответственно, осуществления адресной доставки необходимых векторов в нужные участки сложных нейронных сетей на основе неоднородности популяций нейронов.

Химерные капсиды способны наследовать свойства родительских форм. Например, В. Nauck с коллегами (2003) создавали химерный вектор серотипов AAB1 и 2. Вирусы AAB1 обладают тропизмом к мышечной ткани, AAB2 – к ткани печени. Эти исследователи показали, что использование разных соотношений хелперных плазмид во время трансдукции для капсидов разных серотипов напрямую связано с соотношением количества белковых элементов данных двух серотипов, содержащихся в результирующем капсиде (эксперименты с эффективностью осаждения вирусных частиц на колонке с соответствующими одному из серотипов и нейтрализации антителами к данным серотипам). Однако экспериментальные процедуры, оценивающие эффективность доставки AAV генов фактора свертывания крови IX и $\alpha 1$ -антитрипсина в клетки, отвечающие разным тропизмам обоих серотипов, показали, что эффективность доставки наиболее высока при использовании именно химерных вариантов капсидов. Данный факт свидетельствует о способности химерных капсидов наследовать свойства обоих предковых серотипов.

Отдельного внимания заслуживают методы конструирования капсидов с помощью рекомбиназы Cre-lox (Chan et al., 2017), которые используют loxP-концевые сайты для рекомбинации и/или инактивации целевого гена. С применением этого подхода были разработаны капсиды, трансдуцирующие нейроны ЦНС при внутривенном введении вирусных частиц. Кроме того, рекомбиназа Cre-lox может в процессе активировать ген флуоресцентного белка, место экспрессии которого далее идентифицируется методами флуоресцентной микроскопии, благодаря чему устанавливаются особенности тропизма вектора AAV к малоразмерным анатомическим структурам, например ядрам головного мозга (Deverman et al., 2016).

Решение проблемы вместимости генной кассеты

Одним из главных недостатков AAV является их способность упаковывать ДНК размером лишь ≈ 4.7 – 5.2 кб (Bennett et al., 2017), что ограничивает их применение. Однако существуют работы, демонстрирующие возможность трансдукции протяженных трансгенов, преодолевающих этот предел при высоком титре за счет рекомбинации разделенного генетического материала при упаковке. С учетом того, что для эффективной экспрессии генов необходимы регуляторные элементы в дополнение к терапевтической кодирующей последовательности (CDS), остро стоит вопрос об увеличении вместимости генной кассеты AAV. Сравнивая возможности других вирусов, можно сказать, что аденовирусные векторы способны доставлять последовательности до 37 кб (с использованием помощника) (Wang J.-H. et al., 2024), лен-

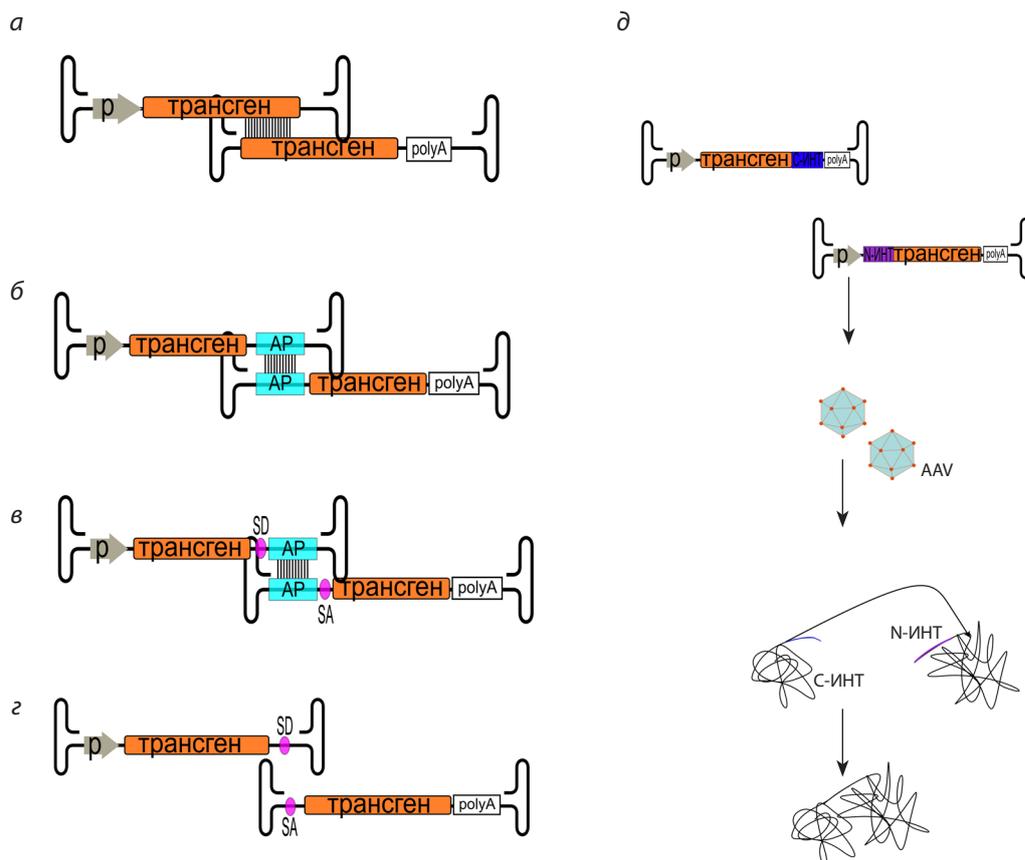
тивирусы – свыше 9 кб (Bulcha et al., 2021), вирус простого герпеса (HSV-1) – свыше 30 кб (Jerusalinsky et al., 2012). В то же время иные способы доставки предполагают еще более значительную вместимость векторных геномов (от 100 кб для фага P1 до 2 Мб для искусственных хромосом дрожжей (YAC) (Bajrai, 2014). Способы решения данной проблемы могут быть связаны с изменением вирусной частицы или оптимизацией самого генетического вектора. Оптимизация вектора может быть достигнута поиском не имеющих важного значения участков последовательности продукта гена либо отказом от каких-либо посттранскрипционных регуляторов. Однако данная стратегия не всегда является лучшим вариантом.

Чтобы преодолеть это ограничение, длинную открытую рамку считывания CDS можно разбить и поместить в отдельные AAV-векторы, которые при совместной трансдукции одной и той же клетки-мишени восстанавливают полную размерную кассету экспрессии трансгена или белка. Этот подход можно разделить на два больших класса: первый, основанный на рекомбинации концевых повторов и высококорекombинирующих последовательностей ДНК (см. рисунок, а–з), а также транс-сплайсинге, и второй, использующий трансбелковый сплайсинг (см. рисунок, д).

Транс-сплайсинг заключается в разделении регуляторного элемента транскрипции или трансгена на две части с их упаковкой в две вирусные частицы. Коинфицирование двумя вирусами приводит к реконструкции цельной кассеты посредством межмолекулярной конкатемеризации, опосредованной инвертированными терминальными повторами. То есть происходит гетеродимеризация, обеспечивающая экспрессию полноразмерного трансгена или увеличение экспрессии трансгена (через cis-активацию).

В рамках первой стратегии большая экспрессионная кассета разделяется на два генома AAV (двойной AAV, см. рисунок), каждый из них содержит одну половину экспрессионной кассеты: 5'-вектор содержит как промотор, так и 5'-половинку CDS, в то время как 3'-вектор – 3'-половинку CDS с сигналом полиаденилирования (см. рисунок, а). Рекомбинация двух векторов и восстановление полноразмерной экспрессионной кассеты происходит либо посредством: (1) последовательностей трансгена, которые повторяются как в конце 5'-вектора, так и в начале 3'-вектора и запускают гомологичную рекомбинацию (перекрывающийся двойной AAV) (см. рисунок, а) (Duan et al., 2001); (2) инвертированных концевых повторов AAV (ITR), которые по своей природе подвергаются межмолекулярной рекомбинации, таким образом, опосредуя конкатемеризацию двух разных геномов AAV (Yan et al., 2000) (не показано); (3) последовательностей с донором и акцептором транс-сплайсинга (см. рисунок, в) или (4) экзогенных коротких высококорекombинантных последовательностей, включенных как в конце 5'-вектора, так и в начале 3'-вектора, которые способствуют объединению двух геномов «голова к хвосту» (AK-последовательность фага F1 и AP1- и AP2-последовательности плацентарной щелочной фосфатазы) (см. рисунок, б, з).

Возможно также объединение последовательностей и подходов, например, высококорекombинирующих последова-



Общая схема объединения трансгенов AAV при использовании метода раздельной доставки вирусных векторов.

Варианты механизмов постинфекционного объединения вирусных трансгенов при использовании: *a* – перекрывающейся части трансгенов; *б* – высокорекombинирующих последовательностей гена щелочной фосфатазы AP; *в* – AP-сайтов совместно с донорами SD и акцепторами SA сплайсинга; *г* – транс-сплайсинга; *д* – трансбелкового сплайсинга между пептидными N- и C-концами

Scheme of AAV transgenes integration using the viral vectors separate delivery method.

Methods for postinfection doubled transgene integration in viral transgenes using: *a* – overlapping part of transgenes; *b* – high recombined sequences in AP alkaline phosphatase gene; *c* – AP-sites together with specific donor and acceptor sequences; *d* – trans-splicing; *e* – transprotein splicing between peptide N- and C-termini

тельностью вместе с сайтами транс-сплайсинга (гибридный, двойной AAV) (Ghosh et al., 2008).

Гомологичная рекомбинация в соматических клетках происходит крайне редко, поэтому очевидно, что наиболее успешными являются гибридные стратегии с использованием транс-сплайсинга. Показана успешная трансдукция генетического материала размером 10 кб, разделенного на два AAV-вируса, и 14 кб – разделенного на три вирусные частицы (Maddalena et al., 2018).

Вторая стратегия основана на белковом сплайсинге, который был открыт в 1990 г. (Wang H. et al., 2022). Это процесс вырезания внутреннего пептида интенеина и лигирования внешних пептидов эктенеинов (см. рисунок, д). Примечательно, что он автокаталитический и не требует дополнительных кофакторов.

Интенеины и эктенеины функциональны. Интенеины чаще всего имеют эндонуклеазную активность, обеспечивающую горизонтальный перенос и «хоуминг» последовательностей, кодирующих их. Эктенеины – это чаще всего ферменты со своими определенными функциями. Когда интенеин находится на разных полипептидных цепях, в окон-

чании первого полипептида и в начале следующего, происходит лигирование двух разных цепей эктенеинов, т. е. трансбелковый сплайсинг. Как раз такой механизм используется для объединения пептидных цепей, закодированных в двух разных AAV-вирусах. Отличие от первого варианта состоит в том, что в обоих векторах должны быть промоторы, последовательности Козак и полиА, чтобы обеспечить трансляцию и образование белкового продукта.

Несмотря на то что выбранные стратегии позволяют увеличить размер доставляемого трансгена, они имеют недостатки, причем общие. Экспрессия укороченных пептидов с одного из векторов может иметь доминантно-негативный или токсический эффект, что возможно преодолеть добавлением сигнальных последовательностей деградации, которые не присутствуют после окончательной сборки. Для РНК это могут быть тандемно повторенные сайты связывания miРНК: miR-let7b, miR-26a, miR-124, miR-204, а для пептидов – дополнительные повторенные стоп-кодона, CL1 дегрон, PB29 дегрон, PEST-сигнал, сшивка с убиквитином (Trapani et al., 2015).

D. Duan с коллегами (2001) исследовали эффективность доставки вектора гена *lacZ* при помощи соединения генов

в клетке *Escherichia coli* тремя способами: перекрываемым сплайсингом (перекрываются области инвертированных повторов, которые удаляются при сплайсинге в клетке), гомологичной рекомбинацией (перекрываются части самой последовательности кДНК) и доставкой цельного гена. Было выявлено, что доставка методом транс-сплайсинга (перекрываемого) менее эффективна, чем доставка цельного гена (15.8 % по уровню экспрессии β-галактозидазы), но более эффективна, чем использование гомологичной рекомбинации для объединения частей гена (трехкратное превышение по уровню экспрессии β-галактозидазы). Преодоление снижения эффективности трансдукции может осуществляться путем оптимизации регуляторных элементов, триплетов и поиском функционально значимых доменов.

Клинические испытания и использование ААВ в терапии

Первые практические результаты были получены уже на фазе I клинических испытаний в 1996 г. при лечении пациентов с цистозным фиброзом путем доставки функциональной копии гена *CFTR*. В 2012 г. Европейское агентство лекарственных средств (European Medicines Agency, EMA) одобрило первый препарат ААВ-терапии Glybera, который содержал рекомбинантный продукт ААВ, доставляющий ген липопротеинлипазы человека (*LPL*) для лечения наследственной недостаточности липопротеинлипазы (LPLD). Одним из последних одобренных препаратов является Zolgensma (*Zonasemnogene aberarvovec*), зарегистрированный в 2019 г., содержащий продукт ААВ, который включает в себя функциональную копию гена *SMN1* для лечения спинально-мышечной атрофии 1-го типа (SMA1) (He et al., 2021).

Проведен также ряд исследований для изучения терапевтического потенциала ААВ-доставки генов в центральную нервную систему для лечения различных неврологических заболеваний. Первоначально гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) был препятствием на пути продуктов ААВ к мишени, однако в 2009 г. K.D. Foust с коллегами сообщили об успешной доставке гена *GFP* (green fluorescent protein) при внутривенном введении ААВ9 (серотип 9) в головной и спинной мозг (Foust et al., 2009).

Значительное количество работ посвящено также поиску методов лечения гемофилии А- и В-типов. Для достижения данной цели предлагалось оптимизировать доставку генов факторов свертывания крови FVIII и FXI соответственно для этих двух типов гемофилий. В 1997 г. впервые проведены процедуры, позволившие обеспечить стабильную экспрессию человеческого фактора свертывания крови FIX (hFIX) с применением рекомбинантного ААВ, путем внутримышечного введения инъекции или использования для этой цели воротной вены печени (Wang J.-H. et al., 2024). Исследователи сталкивались с рядом трудностей при его трансдукции. Так, было отмечено наличие иммунного ответа при умеренных дозах введения ААВ-доставщиков: антитела вырабатывались в ответ как на введение капсидов (ААВ8), так и на наличие в крови последовательности гена *FIX* (Nathwani et al., 2011). Кроме того, повышение активности *FIX* было низким (до 2–11 % от физиологически нормального от < 1 %

изначального) (Nathwani et al., 2011). Эти проблемы были решены путем оптимизации кодонов и тропизма капсида к клеткам печени (Wang J.-H. et al., 2024). Таким образом, в 2022 г. на рынке появился препарат Hemgenix для терапии гемофилии В на основе рекомбинантного капсида ААВ5 с измененной последовательностью *FIX* (R338L), способный увеличивать активность фермента до 40-кратного показателя (George et al., 2017).

Препарат для терапии гемофилии А, Roctavian, был одобрен FDA уже в 2023 г. (Wang J.-H. et al., 2024). На пути к получению функционального синтеза физиологически нормального фактора FVIII также возник ряд проблем: крупная длина трансгена FVIII для ААВ-доставки (порядка 7 кб) и снижение синтеза FVIII в организме пациентов со временем (приблизительно через два года) (George et al., 2021). Данные преграды были преодолены путем делеции части последовательности FVIII, в результате чего конечный вектор содержит только усеченный В-домен; использованием тканеспецифичного промотора (Mahlangu et al., 2023) TTR; оптимизации кодонов (снижение использования CpG-последовательностей по сравнению исходным FVIII) с уменьшением разнообразия аминокислот (патент США US20170216408A1 (Anguela, Shen, 2016)).

В 2017 г. был одобрен препарат для терапии врожденного амавроза Лебера – заболевания, связанного с деградацией светочувствительных элементов сетчатки при недостатке белка RPE (ген *RPE65*, полная трансретинизомераза). Модификации вектора ААВ2 заключались в добавлении последовательности Козак (место старта трансляции); промотора гибридного β-актина курицы (CBA) с CBA-экзоном; быстро раннего энхансера цитомегаловируса (cytomegalovirus immediate early enhancer). В данном случае потребовалось увеличение длины последовательности на 6.5 кб одноцепочечной ДНК вируса для предотвращения неправильной упаковки ААВ (что привело бы к отсутствию включения трансгена в состав капсида) (Bennicelli et al., 2008).

Заболеванием, связанным с поражением нервной системы, для лечения которого одобрен соответствующий препарат, является дефицит декарбоксилазы ароматических L-аминокислот (ДДАА) (ген *DDC*). Данный фермент ответственен за синтез нейромедиаторов дофамина и серотонина из конечных предшественников (Kondakova et al., 2022). Это приводит к комбинированному дефициту серотонина, дофамина, норадреналина и адреналина (Wang J.-H. et al., 2024). Более 70 % клинических случаев этого заболевания носит тяжелую форму (Kondakova et al., 2022).

Успешное обеспечение синтеза дофамина реализуется при адресной доставке гена *DDC* к дофаминергическим нейронам черной субстанции и вентральной области покрышки среднего мозга, что потребовало дополнительных решений по оптимизации трансдукции. Был разработан план инъекции препарата Upstaza, содержащего ААВ2-hDDC, в область хвостатого ядра с подобранной дозировкой и координатами введения. Данная проблема является сложноразрешимой, поскольку существует погрешность при введении канюли в области мозга и, кроме того, часть вирусных частиц может перемещаться в смежные области мозга, введение вне ЦНС не представляется возможным. Напри-

мер, W.A. Liguore с коллегами (2019) исследовали влияние выбранных путей введения рекомбинантного вируса (внутрисосудистое и в спинномозговую жидкость) на эффективность трансдукции целевого вектора в такие области головного мозга, как лобная и моторная кора, полосатое тело, таламус и мозжечок. Для этой задачи был создан вектор AAV-PHP.B, представляющий собой AAV9, содержащий часть промотора р41 (1680–1974) и сплайсинговые последовательности AAV2, с капсидом, имеющим 7-аминокислотную вставку (TLAVPFK) между позициями 588 и 589 (Deverman et al., 2016). Было установлено, что выбранные пути введения препарата вирусных частиц влияют на количество копий вирусного генома в клетках. Также существенно различалось количество вирусных геномов при разных дозах введенного препарата. Выяснено, что трансдукция с помощью данного вектора одинаково эффективна при внутрисосудистом введении, но снижается при проходе крови через печень и селезенку и гематоэнцефалический барьер (Liguore et al., 2019). Другой проблемой была обозначена потенциальная канцерогенность метода доставки, что потребовало дополнительных испытаний препарата.

Следует отметить, что одна из проблем безопасности терапевтических препаратов на основе AAV-доставки – их потенциальная токсичность для организма человека при определенных условиях. Например, в сообщении в “Nature Biotechnology” (High-dose AAV gene therapy deaths, 2020) отмечаются случаи гепатотоксичности высоких доз препарата AT132 (лечение X-связанной тубулярной миопатии) (3×10^{14} вирусных геномов/кг массы тела) у пациентов с ранее отмеченными заболеваниями печени. Данный процесс, вероятно, – следствие иммунного CD8 T-клеточного ответа на презентацию капсидов AAV гепатоцитами посредством МНС (Kohn et al., 2023). Роль антигенов также могут выполнять неметилированные CpG-участки или трансгенный белок. Основными побочными эффектами в таком случае выступают тромбальная микроангиопатия или атипичский гемолитический уремический синдром (Kohn et al., 2023). С учетом факта, что от 30 до 70 % взрослого населения обладает иммуногенностью к дтААВ (Kohn et al., 2023), у 59 % обнаружены NAb (Au et al., 2022). Всего по состоянию на 2022 г. зафиксировано 11 летальных исходов вследствие воздействия терапевтических препаратов на основе AAV. При этом в 30 % клинических испытаний были выявлены тяжелые клинические побочные эффекты. Кроме указанных выше патологий, отмечено также нейротоксическое воздействие терапевтических аденоассоциированных вирусов.

Заключение

В настоящем обзоре рассмотрены основные достижения молекулярной биологии, связанные с использованием аденоассоциированной вирусной доставки генов, позволяющей надеяться на излечение большего количества заболеваний, как наследственных, так и другой этиологии. За последнее десятилетие на рынке появилось семь препаратов AAV-терапии, успешно применяемых для лечения генетических заболеваний. Учитывая широкий спектр описываемых возможностей модификации вирусных частиц, связанных с точной оптимизацией их тропизма в тканях, методами сни-

жения иммуногенности и использования разнообразных регуляторных механизмов, можно предположить более активное применение метода AAV-доставки в терапевтических и научно-практических целях.

Список литературы / References

- Anguela X., Shen S.H.-I. CpG reduced factor viii variants, compositions and methods and uses for treatment of hemostasis disorders (U.S. Patent No. US20170216408A1). U.S. Patent and Trademark Office, 2016. <https://patents.google.com/patent/US20170216408A1/en>
- M.N., Skipper K.A., Anakok O. Optimizing retroviral gene expression for effective therapies. *Hum. Gene Ther.* 2013;24(4):363-374. doi 10.1089/hum.2013.062
- Au H.K.E., Isalan M., Mielcarek M. Gene therapy advances: A meta-analysis of AAV usage in clinical settings. *Front. Med.* 2022;8:809118. doi 10.3389/fmed.2021.809118
- Bajpai B. High Capacity Vectors. In: Ravi I., Baunthiyal M., Saxena J. (Eds). *Advances in Biotechnology*. New Delhi: Springer, 2014;1-10. doi 10.1007/978-81-322-1554-7_1
- Bennett A., Mietzsch M., Agbandje-McKenna M. Understanding capsid assembly and genome packaging for adeno-associated viruses. *Future Virol.* 2017;12(6):283-297. doi 10.2217/fvl-2017-0011
- Bencicelli J., Wright J.F., Komaromy A., Jacobs J.B., Hauck B., Zelenia O., Mingozzi F., Hui D., Chung D., Rex T.S., Wei Z., Qu G., Zhou S., Zeiss C., Arruda V.R., Acland G.M., Dell’Osso L.F., High K.A., Maguire A.M., Bennett J. Reversal of blindness in animal models of Leber congenital amaurosis using optimized AAV2-mediated gene transfer. *Mol. Ther.* 2008;16(3):458-465. doi 10.1038/sj.mt.6300389
- Bijlani S., Pang K.M., Sivanandam V., Singh A., Chatterjee S. The role of recombinant AAV in precise genome editing. *Front. Genome Ed.* 2022;3:799722. doi 10.3389/fgeed.2021.799722
- Bulcha J.T., Wang Y., Ma H., Tai P.W.L., Gao G. Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2021;6(1):53. doi 10.1038/s41392-021-00487-6
- Chan K.Y., Jang M.J., Yoo B.B., Greenbaum A., Ravi N., Wu W.-L., Sánchez-Guardado L., Lois C., Mazmanian S.K., Deverman B.E., Gradinaru V. Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems. *Nat. Neurosci.* 2017;20(8):1172-1179. doi 10.1038/nn.4593
- Chen H., McCarty D., Bruce A., Suzuki K., Suzuki K. Gene transfer and expression in oligodendrocytes under the control of myelin basic protein transcriptional control region mediated by adeno-associated virus. *Gene Ther.* 1998;5(1):50-58. doi 10.1038/sj.gt.3300547
- Cunningham S.C., Dane A.P., Spinoulas A., Alexander I.E. Gene delivery to the juvenile mouse liver using AAV2/8 vectors. *Mol. Ther.* 2008;16(6):1081-1088. doi 10.1038/mt.2008.72
- Deverman B.E., Pravdo P.L., Simpson B.P., Kumar S.R., Chan K.Y., Banerjee A., Wu W.-L., Yang B., Huber N., Pasca S.P., Gradinaru V. Cre-dependent selection yields AAV variants for widespread gene transfer to the adult brain. *Nat. Biotechnol.* 2016;34(2):204-209. doi 10.1038/nbt.3440
- Dimidschstein J., Chen Q., Tremblay R., Rogers S.L., Saldi G.A., Guo L., Xu Q., Liu R., Lu C., Chu J., Grimley J.S., Krostag A.R., Kaykas A., Avery M.C., Rashid M.S., Baek M., Jacob A.L., Smith G.B., Wilson D.E., Kosche G., Kruglikov I., Rusielewicz T., Kotak V.C., Mowery T.M., Anderson S.A., Callaway E.M., Dasen J.S., Fitzpatrick D., Fossati V., Long M.A., Noggle S., Reynolds J.H., Sanes D.H., Rudy B., Feng G., Fishell G. A viral strategy for targeting and manipulating interneurons across vertebrate species. *Nat. Neurosci.* 2016;19(12):1743-1749. doi 10.1038/nn.4430. Epub 2016 Oct 31. Update in: *Nat. Neurosci.* 2017;Jun 27;20(7):1033. doi 10.1038/nn0717-1033d. Erratum in: *Nat. Neurosci.* 2017;20(7):1033. doi 10.1038/nn0717-1033c. PMID: 27798629; PMCID: PMC5348112
- Dirren E., Towne C.L., Setola V., Redmond D.E., Schneider B.L., Aebischer P. Intracerebroventricular injection of adeno-associated virus 6 and 9 vectors for cell type-specific transgene expression in the spinal cord. *Hum. Gene Ther.* 2014;25(2):109-120. doi 10.1089/hum.2013.021
- Drozdz U.S., Lanshakov D.A. Creation of the viral vectors for the inhibition of the serotonergic neurons using light sensitive proton pump. *Integr. Physiol.* 2020;1(2):144-146. doi 20200717151143357
- Drozdz U.S., Lanshakov D.A., Dygalo N.N. Dorsal raphe nucleus serotonergic neuron activity is necessary for the manifestation of the anti-

- depressant effect of ketamine. *Neurochem. J.* 2023;17(3):394-401. doi 10.1134/S181971242303008X
- Duan D., Yue Y., Engelhardt J.F. Expanding AAV packaging capacity with trans-splicing or overlapping vectors: A quantitative comparison. *Mol. Ther.* 2001;4(4):383-391. doi 10.1006/mthe.2001.0456
- Dygalo N.N., Lanshakov D.A., Komysheva N.P., Drozd U.S., Shaburova E.V., Sukhareva E.V., Shishkina G.T. Chemogenetic activation of glutamatergic neurons in the juvenile rat cortex reduces anxiety. *Dokl. Biochem. Biophys.* 2020;490(1):16-18. doi 10.1134/S1607672920010056
- Eichhoff A.M., Börner K., Albrecht B., Schäfer W., Baum N., Haag F., Körbelin J., Trepel M., Braren I., Grimm D., Adriouch S., Koch-Nolte F. Nanobody-enhanced targeting of AAV gene therapy vectors. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2019;15:211-220. doi 10.1016/j.omtm.2019.09.003
- Flotte T.R., Afione S.A., Conrad C., McGrath S.A., Solow R., Oka H., Zeitlin P.L., Guggino W.B., Carter B.J. Stable *in vivo* expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with an adeno-associated virus vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993;90(22):10613-10617. doi 10.1073/pnas.90.22.10613
- Foust K.D., Nurre E., Montgomery C.L., Hernandez A., Chan C.M., Kasper B.K. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat. Biotechnol.* 2009;27(1):59-65. doi 10.1038/nbt.1515
- George L.A., Sullivan S.K., Giermasz A., Rasko J.E.J., Samelson-Jones B.J., Ducore J., Cuker A., Sullivan L.M., Majumdar S., Teitel J., McGuinn C.E., Ragni M.V., Luk A.Y., Hui D., Wright J.F., Chen Y., Liu Y., Wachtel K., Winters A., Tiefenbacher S., Arruda V.R., Van Der Loo J.C.M., Zelenia O., Takefman D., Carr M.E., Couto L.B., Anguela X.M., High K.A. Hemophilia B gene therapy with a high-specific-activity factor IX variant. *N. Engl. J. Med.* 2017;377(23):2215-2227. doi 10.1056/NEJMoa1708538
- George L.A., Monahan P.E., Eyster M.E., Sullivan S.K., Ragni M.V., Croteau S.E., Rasko J.E.J., Recht M., Samelson-Jones B.J., MacDougall A., Jaworski K., Noble R., Curran M., Kuranda K., Mingozi F., Chang T., Reape K.Z., Anguela X.M., High K.A. Multiyear factor VIII expression after AAV gene transfer for hemophilia A. *N. Engl. J. Med.* 2021;385(21):1961-1973. doi 10.1056/NEJMoa2104205
- Ghosh A., Yue Y., Lai Y., Duan D. A hybrid vector system expands adeno-associated viral vector packaging capacity in a transgene-independent manner. *Mol. Ther.* 2008;16(1):124-130. doi 10.1038/sj.mt.6300322
- Gilham D.E., Lie-A-Ling M., Taylor N., Hawkins R.E. Cytokine stimulation and the choice of promoter are critical factors for the efficient transduction of mouse T cells with HIV-1 vectors. *J. Gene Med.* 2010;12(2):129-136. doi 10.1002/jgm.1421
- Gray S.J., Foti S.B., Schwartz J.W., Bachaboina L., Taylor-Blake B., Coleman J., Ehlers M.D., Zylka M.J., McCown T.J., Samulski R.J. Optimizing promoters for recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in the peripheral and central nervous system using self-complementary vectors. *Hum. Gene Ther.* 2011;22(9):1143-1153. doi 10.1089/hum.2010.245
- Greig J.A., Martins K.M., Breton C., Lamontagne R.J., Zhu Y., He Z., White J., Zhu J.-X., Chichester J.A., Zheng Q., Zhang Z., Bell P., Wang L., Wilson J.M. Integrated vector genomes may contribute to long-term expression in primate liver after AAV administration. *Nat. Biotechnol.* 2024;42(8):1232-1242. doi 10.1038/s41587-023-01974-7
- Grimm D., Lee J.S., Wang L., Desai T., Akache B., Storm T.A., Kay M.A. *In vitro* and *in vivo* gene therapy vector evolution via multispecies interbreeding and retargeting of adeno-associated viruses. *J. Virol.* 2008;82(12):5887-5911. doi 10.1128/JVI.00254-08
- Hamilton H., Gomos J., Berns K.I., Falck-Pedersen E. Adeno-associated virus site-specific integration and AAVS1 disruption. *J. Virol.* 2004;78(15):7874-7882. doi 10.1128/JVI.78.15.7874-7882.2004
- Han Z., Luo N., Wu Y., Kou J., Ma W., Yang X., Cai Y., Ma L., Han L., Wang X., Qin H., Shi Q., Wang J., Ye C., Lin K., Xu F. AAV13 enables precise targeting of local neural populations. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(21):12806. doi 10.3390/ijms232112806
- Han Z., Luo N., Ma W., Liu X., Cai Y., Kou J., Wang J., Li L., Peng S., Xu Z., Zhang W., Qiu Y., Wu Y., Ye C., Lin K., Xu F. AAV11 enables efficient retrograde targeting of projection neurons and enhances astrocyte-directed transduction. *Nat. Commun.* 2023;14(1):3792. doi 10.1038/s41467-023-39554-7
- Hauck B., Chen L., Xiao W. Generation and characterization of chimeric recombinant AAV vectors. *Mol. Ther.* 2003;7(3):419-425. doi 10.1016/S1525-0016(03)00012-1
- He X., Urip B.A., Zhang Z., Ngan C.C., Feng B. Evolving AAV-delivered therapeutics towards ultimate cures. *J. Mol. Med.* 2021;99(5):593-617. doi 10.1007/s00109-020-02034-2
- Higashimoto T., Urbinati F., Perumbeti A., Jiang G., Zarzuela A., Chang L.-J., Kohn D.B., Malik P. The woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element reduces readthrough transcription from retroviral vectors. *Gene Ther.* 2007;14(17):1298-1304. doi 10.1038/sj.gt.3302979
- High-dose AAV gene therapy deaths. *Nat. Biotechnol.* 2020;38(8):910. doi 10.1038/s41587-020-0642-9
- Hioeki H., Kameda H., Nakamura H., Okunomiya T., Ohira K., Nakamura K., Kuroda M., Furuta T., Kaneko T. Efficient gene transduction of neurons by lentivirus with enhanced neuron-specific promoters. *Gene Ther.* 2007;14(11):872-882. doi 10.1038/sj.gt.3302924
- Hollensen A.K., Thomsen R., Bak R.O., Petersen C.C., Ermegaard E.R., Aagaard L., Damgaard C.K., Mikkelsen J.G. Improved microRNA suppression by WPRE-linked tough decoy microRNA sponges. *RNA.* 2017;23(8):1247-1258. doi 10.1261/rna.061192.117
- Horowitz E.D., Weinberg M.S., Asokan A. Glycated AAV vectors: chemical redirection of viral tissue tropism. *Bioconjug. Chem.* 2011;22(4):529-532. doi 10.1021/bc100477g
- Husain T., Passini M.A., Parente M.K., Fraser N.W., Wolfe J.H. Long-term AAV vector gene and protein expression in mouse brain from a small pan-cellular promoter is similar to neural cell promoters. *Gene Ther.* 2009;16(7):927-932. doi 10.1038/gt.2009.52
- Issa S.S., Shaimardanova A.A., Solovyeva V.V., Rizvanov A.A. Various AAV serotypes and their applications in gene therapy: An overview. *Cells.* 2023;12(5):785. doi 10.3390/cells12050785
- Jerusalinsky D., Baez M.V., Epstein A.L. Herpes simplex virus type 1-based amplicon vectors for fundamental research in neurosciences and gene therapy of neurological diseases. *J. Physiol. Paris.* 2012;106(1-2):2-11. doi 10.1016/j.jphysparis.2011.11.003
- Johnson F.B., Ozer H.L., Hoggan M.D. Structural proteins of adenovirus-associated virus type 3. *J. Virol.* 1971;8(6):860-863. doi 10.1128/jvi.8.6.860-863.1971
- Kanaan N.M., Sellnow R.C., Boye S.L., Coberly B., Bennett A., Agbandje-McKenna M., Sortwell C.E., Hauswirth W.W., Boye S.E., Manfredson F.P. Rationally engineered AAV capsids improve transduction and volumetric spread in the CNS. *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2017;8:184-197. doi 10.1016/j.omtn.2017.06.011
- Katwal A.B., Konkalmatt P.R., Piras B.A., Hazarika S., Li S.S., John Lye R., Sanders J.M., Ferrante E.A., Yan Z., Annex B.H., French B.A. Adeno-associated virus serotype 9 efficiently targets ischemic skeletal muscle following systemic delivery. *Gene Ther.* 2013;20(9):930-938. doi 10.1038/gt.2013.16
- Koerber J.T., Jang J.-H., Schaffer D.V. DNA shuffling of adeno-associated virus yields functionally diverse viral progeny. *Mol. Ther.* 2008;16(10):1703-1709. doi 10.1038/mt.2008.167
- Kohn D.B., Chen Y.Y., Spencer M.J. Successes and challenges in clinical gene therapy. *Gene Ther.* 2023;30(10-11):738-746. doi 10.1038/s41434-023-00390-5
- Kondakova O.B., Kazakova K.A., Lyalina A.A., Lapshina N.V., Pushkov A.A., Mazanova N.N., Davydova Yu.I., Grebenkin D.I., Kanivets I.V., Savostyanov K.V. Family case of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Neuromuscul. Dis.* 2022;12(4):88-98. doi 10.17650/2222-8721-2022-12-4-88-98
- Kuroda H., Kutner R.H., Bazan N.G., Reiser J. A comparative analysis of constitutive and cell-specific promoters in the adult mouse hippocampus using lentivirus vector-mediated gene transfer. *J. Gene Med.* 2008;10(11):1163-1175. doi 10.1002/jgm.1249
- Lanshakov D.A., Drozd U.S., Dygalo N.N. Optogenetic stimulation increases level of antiapoptotic protein Bcl-xL in neurons. *Biochemistry (Mosc).* 2017a;82(3):340-344. doi 10.1134/S0006297917030129
- Lanshakov D.A., Drozd U.S., Zapara T.A., Dygalo N.N. Transfer of optogenetic vectors into the brain of neonatal animals to study neuron functions during subsequent periods of development. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2017b;7(3):266-272. doi 10.1134/S2079059717030078
- Lanshakov D.A., Sukhareva E.V. Development of genetic engineering tools for p75^{ngfr} methylation and expression modulation. *J. Biosci. Med.* 2020;08(11):197-207. doi 10.4236/jbm.2020.811018
- Liguore W.A., Domire J.S., Button D., Wang Y., Dufour B.D., Srinivasan S., McBride J.L. AAV-PHP.B administration results in a differential pattern

- of CNS biodistribution in non-human primates compared with mice. *Mol. Ther.* 2019;27(11):2018-2037. doi 10.1016/j.yymthe.2019.07.017
- Maddalena A., Tornabene P., Tiberi P., Minopoli R., Manfredi A., Mutarelli M., Rossi S., Simonelli F., Naggert J.K., Cacchiarelli D., Auricchio A. Triple vectors expand AAV transfer capacity in the retina. *Mol. Ther.* 2018;26(2):524-541. doi 10.1016/j.yymthe.2017.11.019
- Mahlangu J., Kaczmarek R., Von Drygalski A., Shapiro S., Chou S.-C., Ozeilo M.C., Kenet G., Peyvandi F., Wang M., Madan B., Key N.S., Laffan M., Dunn A.L., Mason J., Quon D.V., Symington E., Leavitt A.D., Oldenburg J., Chambost H., Reding M.T., Jayaram K., Yu H., Mahajan R., Chavele K.-M., Reddy D.B., Henshaw J., Robinson T.M., Wong W.Y., Pipe S.W. Two-year outcomes of valoctocogene roxaparvovec therapy for hemophilia A. *N. Engl. J. Med.* 2023;388(8):694-705. doi 10.1056/NEJMoa2211075
- Nakai H., Yant S.R., Storm T.A., Fuess S., Meuse L., Kay M.A. Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction *in vivo*. *J. Virol.* 2001;75(15):6969-6976. doi 10.1128/JVI.75.15.6969-6976.2001
- Nathwani A.C., Tuddenham E.G.D., Rangarajan S., Rosales C., McIntosh J., Linch D.C., Chowdhury P., Riddell A., Pie A.J., Harrington C., O'Beirne J., Smith K., Pasi J., Glader B., Rustagi P., Ng C.Y.C., Kay M.A., Zhou J., Spence Y., Morton C.L., Allay J., Coleman J., Sleep S., Cunningham J.M., Srivastava D., Basner-Tschakarjan E., Mingozzi F., High K.A., Gray J.T., Reiss U.M., Nienhuis A.W., Davidoff A.M. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* 2011;365(25):2357-2365. doi 10.1056/NEJMoa1108046
- Pham Q., Glicksman J., Chatterjee A. Chemical approaches to probe and engineer AAV vectors. *Nanoscale.* 2024;16(29):13820-13833. doi 10.1039/D4NR01300J
- Piedra-Quintero Z.L., Wilson Z., Nava P., Guerau-de-Arellano M. CD38: An immunomodulatory molecule in inflammation and autoimmunity. *Front. Immunol.* 2020;11:597959. doi 10.3389/fimmu.2020.597959
- Powell S.K., Rivera-Soto R., Gray S.J. Viral expression cassette elements to enhance transgene target specificity and expression in gene therapy. *Discov. Med.* 2015;19(102):49-57
- Qin J.Y., Zhang L., Clift K.L., Hular I., Xiang A.P., Ren B.-Z., Lahn B.T. Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter. *PLoS One.* 2010;5(5):e10611. doi 10.1371/journal.pone.0010611
- Qiu J., Pintel D.J. Alternative polyadenylation of adeno-associated virus type 5 RNA within an internal intron is governed by the distance between the promoter and the intron and is inhibited by U1 small nuclear RNP binding to the intervening donor. *J. Biol. Chem.* 2004;279(15):14889-14898. doi 10.1074/jbc.M312734200
- Rabinowitz J.E., Rolling F., Li C., Conrath H., Xiao W., Xiao X., Samulski R.J. Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J. Virol.* 2002;76(2):791-801. doi 10.1128/JVI.76.2.791-801.2002
- Rissiek B., Lukowiak M., Raczkowski F., Magnus T., Mittrücker H.-W., Koch-Nolte F. *In vivo* blockade of murine ARTC2.2 during cell preparation preserves the vitality and function of liver tissue-resident memory T cells. *Front. Immunol.* 2018;9:1580. doi 10.3389/fimmu.2018.01580
- Segura M.M., Kamen A., Garnier A. Downstream processing of oncoretroviral and lentiviral gene therapy vectors. *Biotechnol. Adv.* 2006;24(3):321-337. doi 10.1016/j.biotechadv.2005.12.001
- Shi W., Arnold G.S., Bartlett J.S. Insertional mutagenesis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and generation of AAV2 vectors targeted to alternative cell-surface receptors. *Hum. Gene Ther.* 2001;12(14):1697-1711. doi 10.1089/104303401750476212
- Shokoples B.G., Paradis P., Schiffrin E.L. P2X7 receptors: An untapped target for the management of cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2021;41(1):186-199. doi 10.1161/ATVBAHA.120.315116
- Srivastava A. *In vivo* tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. *Curr. Opin. Virol.* 2016;21:75-80. doi 10.1016/j.coviro.2016.08.003
- Stemmer W.P.C. Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature.* 1994;370(6488):389-391. doi 10.1038/370389a0
- Talbot G.E., Waddington S.N., Bales O., Tchen R.C., Antoniou M.N. Desmin-regulated lentiviral vectors for skeletal muscle gene transfer. *Mol. Ther.* 2010;18(3):601-608. doi 10.1038/mt.2009.267
- Tervo D.G.R., Hwang B.-Y., Viswanathan S., Gaj T., Lavzin M., Ritola K.D., Lindo S., Michael S., Kuleshova E., Ojala D., Huang C.-C., Gerfen C.R., Schiller J., Dudman J.T., Hantman A.W., Looger L.L., Schaffer D.V., Karpova A.Y. A designer AAV variant permits efficient retrograde access to projection neurons. *Neuron.* 2016;92(2):372-382. doi 10.1016/j.neuron.2016.09.021
- Trapani I., Toriello E., De Simone S., Colella P., Iodice C., Polishchuk E.V., Sommella A., Colecchi L., Rossi S., Simonelli F., Giunti M., Bacci M.L., Polishchuk R.S., Auricchio A. Improved dual AAV vectors with reduced expression of truncated proteins are safe and effective in the retina of a mouse model of Stargardt disease. *Hum. Mol. Genet.* 2015;24(23):6811-6825. doi 10.1093/hmg/ddv386
- Wang B., Li J., Fu F.H., Chen C., Zhu X., Zhou L., Jiang X., Xiao X. Construction and analysis of compact muscle-specific promoters for AAV vectors. *Gene Ther.* 2008;15(22):1489-1499. doi 10.1038/gt.2008.104
- Wang D., Tai P.W.L., Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2019;18(5):358-378. doi 10.1038/s41573-019-0012-9
- Wang H., Wang L., Zhong B., Dai Z. Protein splicing of inteins: A powerful tool in synthetic biology. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2022;10:810180. doi 10.3389/fbioe.2022.810180
- Wang J.-H., Gessler D.J., Zhan W., Gallagher T.L., Gao G. Adeno-associated virus as a delivery vector for gene therapy of human diseases. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2024;9(1):78. doi 10.1038/s41392-024-01780-w
- Xu R., Janson C., Mastakov M., Lawlor P., Young D., Mouravlev A., Fitzsimons H., Choi K.-L., Ma H., Dragunow M., Leone P., Chen Q., Dicker B., During M. Quantitative comparison of expression with adeno-associated virus (AAV-2) brain-specific gene cassettes. *Gene Ther.* 2001;8(17):1323-1332. doi 10.1038/sj.gt.3301529
- Yan Z., Zhang Y., Duan D., Engelhardt J.F. Trans-splicing vectors expand the utility of adeno-associated virus for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000;97(12):6716-6721. doi 10.1073/pnas.97.12.6716
- Yan Z., Yan H., Ou H. Human thyroxine binding globulin (TBG) promoter directs efficient and sustaining transgene expression in liver-specific pattern. *Gene.* 2012;506(2):289-294. doi 10.1016/j.gene.2012.07.009
- Zhou X., Zeng X., Fan Z., Li C., McCown T., Samulski R.J., Xiao X. Adeno-associated virus of a single-polarity DNA genome is capable of transduction *in vivo*. *Mol. Ther.* 2008;16(3):494-499. doi 10.1038/sj.mt.6300397
- Zinn E., Pacouret S., Khaychuk V., Turunen H.T., Carvalho L.S., Andres-Mateos E., Shah S., Shelke R., Maurer A.C., Plovie E., Xiao R., Vandenberghe L.H. *In silico* reconstruction of the viral evolutionary lineage yields a potent gene therapy vector. *Cell Rep.* 2015;12(6):1056-1068. doi 10.1016/j.celrep.2015.07.019

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 31.08.2024. После доработки 21.10.2024. Принята к публикации 24.10.2024.

 pismavavilov.ru

DOI 10.18699/letvjgb-2024-10-25

Обзор

Роль метилирования m6A мРНК в патогенезе злокачественной опухоли

В.П. Николин¹, Н.А. Попова^{1,2}, Е.Ю. Рыкова^{1,3} 

Аннотация: Обратимое метилирование мРНК – модификация N6-метиладенозина (m6A) – оказывает влияние почти на все стадии ее метаболизма. Динамические и обратимые процессы регулируются «записывающими» m6A-метилтрансферазами, «стирающими» m6A-деметилазами и «считывающими» m6A-связывающими белками. Эти регуляторы распознают, добавляют или удаляют сайты, модифицированные m6A, соответствующим образом изменяя биологические процессы. m6A присутствует во многих мРНК, кодируемых генами, связанными с заболеваниями человека, в том числе онкологическими. Роль модификации m6A мРНК в возникновении опухоли и ее прогрессии связана главным образом с активацией экспрессии онкогенов и подавлением экспрессии генов опухолевой супрессии. В зависимости от уровня метилирования аденозина, экспрессии и активности соответствующих ферментов эта модификация мРНК может приводить как к активации, так и к торможению роста опухоли. Показано участие m6A совместно с другими эпигенетическими модификациями в регуляции возникновения, развития и прогрессии опухоли, в частности в ангиогенезе. Молекулярный механизм действия метилтрансферазы METTL3 является возможной мишенью для диагностики и лечения онкологических заболеваний, что важно для практической медицины. Об этом говорит влияние на рост опухоли ингибиторов METTL3 и ангиогенеза, показавших эффективность при некоторых типах опухолей.

Ключевые слова: m6A модификация мРНК; онкогенез; микроокружение опухоли; ангиогенез; транспозоны; взаимосвязь m6A с хроматином.

Для цитирования: Николин В.П., Попова Н.А., Рыкова Е.Ю. Роль метилирования m6A мРНК в патогенезе злокачественной опухоли. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;10(4):216-223. DOI 10.18699/letvjgb-2024-10-25

Финансирование: Работа выполнена при поддержке федерального бюджетного проекта FWNR-2022-0016.

Review

The role of m6A mRNA methylation in the pathogenesis of a malignant tumor

V.P. Nikolin¹, N.A. Popova^{1,2}, E.Y. Rykova^{1,3} 

Abstract: Reversible methylation of mRNA – modification of N6-methyladenosine (m6A) – affects almost all stages of its metabolism. Dynamic and reversible processes are regulated by “writing” m6A-methyltransferases, “erasing” m6A-demethylases and “reading” m6A-binding proteins. These regulators recognize, add or remove sites modified by m6A, changing biological processes accordingly. m6A is present in many mRNAs encoded by genes associated with human diseases, including cancer. The role of m6A mRNA modification in tumor formation and progression is mainly associated with activation of oncogenes expression and suppression of suppressor gene expression. At the same time, depending on the modulation of m6A levels, expression and activity of m6A enzymes and other factors, this modification of mRNA can lead to both activation and inhibition of tumor growth. Great importance is attached to the participation of m6A in the regulation of tumor angiogenesis, as well as its progression, in the relationship between m6A and other epigenetic modifications, a violation of the regulation of which can cause oncogenesis. The underlying molecular mechanism of METTL3 is a possible target for the treatment and diagnosis of human diseases, which, according to results, could be useful in the diagnostics and treatment of malignancies. This is evidenced by the effect on tumor growth of METTL3 and angiogenesis inhibitors, which have shown efficacy in some types of cancer.

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 Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия
Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Новосибирский государственный технический университет, Новосибирск, Россия
Novosibirsk State Technical University, Novosibirsk, Russia

 rykova.elena.2014@gmail.com

 © Николин В.П., Попова Н.А., Рыкова Е.Ю., 2024

Key words: m6A mRNA; oncogenesis; tumor microenvironment; angiogenesis; transposons; relationship of m6A with chromatin.

For citation: Nikolin V.P., Popova N.A., Rykova E.Y. The role of m6A mRNA methylation in the pathogenesis of a malignant tumor. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;10(4):216-223. DOI 10.18699/letvjgb-2024-10-25 (in Russian)

Funding: This work was supported by State Budgetary Project FWNR-2022-0016.

Регуляторы модификации m6A РНК

Эпигенетика модулирует экспрессию генов без изменения последовательности ДНК. Вместе с модификациями гистонов, ремоделированием хроматина, ковалентными модификациями ДНК (Baylin, Jones, 2011; Robertson, 2005) обратимое метилирование мРНК является одним из механизмов в сложной сети эпигенетической регуляции экспрессии, который происходит на посттранскрипционном уровне и влияет на многие клеточные и организменные процессы.

Метилирование аденозина по шестому атому азота (N⁶-метиладенозин – m6A) в различных типах РНК считается наиболее распространенной, особенно в эукариотических мРНК, консервативной внутренней транскрипционной модификацией. Модификация m6A в основном концентрируется вблизи стоп-кодона, 3'-нетранслируемых концевых областей (UTR) (Dominissini et al., 2012; Meyer et al., 2012). Установлено, что около 20 % мРНК человека метилировано (Voccaletto et al., 2018). Динамические и обратимые процессы регулируются «записывающими» m6A-метилтрансферазами, «стирающими» m6A-деметилазами и «считывающими» m6A-связывающими белками. Эти регуляторы распознают, добавляют или удаляют сайты, модифицированные m6A, что приводит к изменению ряда биологических процессов. Перекрестная связь между «записывающими», «стирающими» и «считывающими» белками/комплексами белков вовлечена в возникновение и прогрессирование онкологических заболеваний (Deng X. et al., 2018; Panneerdoss et al., 2018).

N⁶-метиладенозин оказывает влияние почти на все стадии метаболизма мРНК, включая трансляцию, деградацию, сплайсинг, экспорт и фолдинг (Liu Q., Gregory, 2019). Метилирование катализируется комплексом метилтрансфераз, в который входят METTL3, METTL14, WTAP и другие вспомогательные компоненты, известные как «записывающие» m6A (Su et al., 2024). Основную каталитическую роль в процессе модификации m6A выполняет субъединица комплекса метилтрансфераза METTL3 (Methyltransferase like 3). Этот фермент приводит к метилированию специфических мРНК-мишеней и участвует в разных физиологических процессах, таких как эмбриональное развитие (Wang Y. et al., 2014), развитие мозга (Hess et al., 2013), перепрограммирование клеток (Aguilo et al., 2015) и гомеостаз Т-клеток (Li H.B. et al., 2017). METTL14 (Methyltransferase like 14) тоже является ключевым ферментом метилтрансферазного комплекса. Он взаимодействует с METTL3 и служит ее структурной поддержкой. Вместе они образуют основной комплекс метилтрансферазы, синергически индуцирующий модификацию m6A (Wang P. et al., 2016). Различные типы «записывающих» ферментов, взаимодействуя друг с другом, могут влиять на прогрессирование некоторых заболеваний, например колоректальный рак (Chen et al., 2021).

мРНК деметируется по m6A ферментами FTO (fat mass and obesity associated) и ALKBH5 (alkB homolog 5), которые называют «стирающими», или «ластиком», и распознается «считывающими» m6A-связывающими белками YTHDF1/2/3, IGF2BP1, HNRNPA2B1. Деметилазы играют роль стирающих агентов для удаления модификаций m6A в мРНК. FTO и ALKBH5 избирательно удаляют метильный код из целевой мРНК, демонстрируя, таким образом, обратимую и динамическую регуляцию m6A (Jia et al., 2011; Zheng et al., 2013). Дефицит, а также избыточная экспрессия ферментов изменяют внутриклеточные уровни m6A, что влияет на многие биологические процессы в опухолевых клетках. Различные «считывающие» m6A белки определяют дальнейшую судьбу m6A-модифицированных мРНК посредством влияния на пути формирования и метаболизма мРНК (Su et al., 2024).

Показано, что мРНК, содержащие N⁶-метиладенозин 5'-нетранслируемой области (5'-UTR), могут транслироваться независимо от кэпирования образом. При этом различные клеточные стрессы индуцируют перераспределение m6A в масштабах транскриптома, что приводит к увеличению числа мРНК, содержащих m6A в 5'-UTR. Повышенные уровни m6A в мРНК Hsp70 после теплового шока регулируют кэп-независимую трансляцию, тогда как ингибирование метилирования аденозина избирательно снижает трансляцию мРНК, содержащих m6A в 5'-UTR. Таким образом, m6A в 5'-UTR является обходным путем, не требующим взаимодействия с 5' кэп-связывающими белками, что способствует интенсивной трансляции при стрессах (Meyer et al., 2015).

Влияние модификации m6A РНК на экспрессию онкогенов и генов-супрессоров опухоли

Онкогены – это потенциальные индукторы онкогенеза. К их структурным аналогам относятся гены, кодирующие белки, которые играют центральную роль в регуляции процессов роста и развития организма, например: факторы роста, их рецепторы, транскрипционные факторы и белки, вовлеченные в трансдукцию сигналов. В злокачественных опухолях наблюдается активация экспрессии онкогенов и подавление экспрессии генов опухолевой супрессии (Garraway, Linder, 2013). m6A присутствует во многих мРНК, кодируемых генами, связанными с онкологическими заболеваниями человека. При этом, как установлено многочисленными исследованиями, аберрантные регуляторы m6A функционируют либо как опухолевые супрессоры, либо как онкогены при различных типах опухолей (He et al., 2019). Таким образом, есть основания предполагать, что аберрантное метилирование аденозина по шестому атому азота в мРНК, влияя на экспрессию генов, может стать причиной возникновения опухоли и ее прогрессии.

В обзоре (He et al., 2019) приведены результаты исследований разных авторов по влиянию модификации m6A РНК

на процессы, индуцирующие возникновение и прогрессирование опухоли. В этих исследованиях практически во всех опухолях (девять опухолей различного гистологического типа) показано повышение уровня метилтрансферазы METTL3, связанное с усилением клеточной пролиферации, прогрессированием опухоли, метастазированием и плохим прогнозом, которое приводило к повышению экспрессии тех или иных онкогенов. Кроме того, при изучении таких опухолей, как гепатоцеллюлярная карцинома, рак поджелудочной железы, светлоклеточный почечно-клеточный рак, показано, что повышенный уровень т6А ингибирует экспрессию генов опухолевой супрессии (He et al., 2019).

В этой связи представляется существенным исследование влияния модификации т6А РНК на экспрессию известного онкогена *c-myc*. Белковый продукт гена *c-myc* является важным фактором, который способствует индукции и развитию опухоли, регулируя экспрессию нижележащих генов-мишеней. По данным (Wang X.S. et al., 2018), METTL3 действует как онкоген в клетках миелоидной лейкемии, повышая экспрессию гена *myc*. При этом, как следует из работы (Yang Z. et al., 2020), повышение модификации т6А мРНК МУС, усиливая трансляцию белка МУС, может приводить к неограниченной пролиферации, миграции и инвазии клеток злокачественной опухоли желудка. Эти исследования говорят о том, что модификация т6А мРНК способствует возникновению и прогрессированию опухоли за счет усиления экспрессии онкогенов и ингибирования экспрессии генов опухолевой супрессии, что хорошо согласуется с представлением о роли данных генов в канцерогенезе.

Однако модификация т6А мРНК может привести не только к прогрессированию опухоли, но и к ее подавлению. Это означает, что, с одной стороны, т6А регулирует экспрессию онкогенов и генов опухолевой супрессии, тем самым влияя на прогрессирование болезни, а с другой стороны, в зависимости от модулирования уровня т6А, экспрессии и активности ферментов т6А, влияние на опухолевый процесс может оказаться противоположным и приводить к подавлению роста опухоли (He et al., 2018; Wang S. et al., 2018). Помимо того, на количество и функцию т6А при разных типах опухолей могут оказывать влияние различные факторы, включая онкопротеин (Cai et al., 2018), фактор транскрипции (Aguilo et al., 2015) и фактор передачи сигнала (Bertero et al., 2018). Избыточная экспрессия или снижение количества этих факторов может изменять уровень метилирования т6А в опухолях и препятствовать прогрессированию болезни.

Влияние модификации т6А РНК на микроокружение опухоли

Микроокружение опухоли играет существенную роль в онкогенезе, обладая двойственным потенциалом для подавления или стимулирования развития опухоли. Считается, что важная роль в формировании разнообразия и сложности микроокружения опухоли принадлежит модификации т6А мРНК (Zhang B. et al., 2020). Микроокружение опухоли представляет собой гетерогенную систему, включающую опухолевые клетки, иммунные клетки, клетки стромы и различные неклеточные компоненты, причем все компоненты

системы имеют важное значение в контроле иммунных реакций и прогрессирования опухоли (Su et al., 2024).

Общей характеристикой микроокружения опухолей является способность к иммуносупрессии, которая связана с дисбалансом иммунных и стромальных клеток (Li M. et al., 2021). В иммуносупрессии значительную роль играют регуляторные Т-клетки (Treg). Инфильтрируя микроокружение опухоли, Treg ограничивают защитный иммунный надзор, препятствуют эффективным противоопухолевым иммунным реакциям и способствуют формированию иммуносупрессивного микроокружения (Ma Y. et al., 2023). Кроме того, для микроокружения опухоли характерны гипоксия, нарушение регуляции метаболизма и хроническое воспаление (Gu et al., 2021). Воспалительное микроокружение опухоли вызывает перепрограммирование цитотоксических Т-лимфоцитов в клетке с иммунодепрессивным фенотипом, подобным фенотипу Treg. Это способствует прогрессированию опухоли. При этом активация онкогенов и подавление генов опухолевой супрессии способствуют метаболическому перепрограммированию при онкологическом процессе (Boroughs, DeBerardinis, 2015).

Поскольку микроокружение играет критическую роль в сохранении жизнеспособности опухолевых клеток и их пролиферации на протяжении всего развития опухоли, перепрограммирование метаболизма клеток микроокружения опухоли может повышать эффективность противоопухолевой терапии. В модели мелкоклеточного рака легкого у мышей резистентность к противоопухолевым химиопрепаратам, обусловленная повышенной экспрессией METTL3, значительно снижалась при применении STM2457 (ингибитора METTL3) (Sun Y. et al., 2023).

METTL3 и выполняемая ею модификация т6А мРНК участвуют в изменении микроокружения, воздействуя как на врожденный, так и на адаптивный иммунитет. Макрофаги в микроокружении опухоли представляют наиболее многочисленную популяцию клеток врожденного иммунитета, которая, как правило, неоднородна и может оказывать двойственное влияние на опухоль в зависимости от паттерна активации их генов. «Классически» активированные макрофаги M1 обычно оказывают провоспалительное и противоопухолевое действие, тогда как «альтернативно» активированные макрофаги M2 имеют иммуносупрессивные и проопухолевые функции (Tong et al., 2021).

Результаты исследований показали, что эпигенетические регуляторы влияют на поляризацию макрофагов. Метилтрансфераза METTL3 направляет поляризацию макрофагов по пути M1 метилированием мРНК, которая кодирует STAT1, главный фактор транскрипции, контролирующей поляризацию макрофагов M1. Нокдаун METTL3 посредством трансфекции микроРНК заметно подавлял формирование фенотипа M1 и усиливал поляризацию макрофагов по пути M2. И наоборот, ее сверхэкспрессия посредством трансфекции гена в составе плазмиды значительно облегчала поляризацию макрофагов по пути M1 и снижала количество макрофагов M2 (Liu Y. et al., 2019).

Таким образом, METTL3, метилируя мРНК-мишени в клетках микроокружения опухоли, может влиять на дифференцировку и созревание клеток врожденного и адаптивного

иммунитета, а также на внеклеточное микроокружение, включая метаболиты, цитокины и факторы воспаления. В целом роль m6A является отражением процессов регуляции экспрессии генов, как на уровне опухолевых клеток, так и на уровне микроокружения опухоли. Сложность влияния модификации m6A усугубляется ее зависимостью от конкретного типа клеток или типа опухоли. Кроме того, определенный вклад может вносить взаимосвязь между модификацией m6A и другими эпигенетическими модификациями, нарушение регуляции которых также лежит в основе онкогенеза.

Роль модификации m6A РНК в активации ретроэлементов

Ретротранспозоны LINE-1, L1 (long interspersed nuclear element – длинные диспергированные повторы) являются наиболее распространенными транспонируемыми элементами в геноме человека, составляя приблизительно 17% генома. Перемещаются в геноме по механизму «копирования-вставки», включающему обратную транскрипцию промежуточной РНК и вставку ее кДНК копии в новый участок генома. Они экспрессируются и подвижны в клетках зародышевой линии, в эмбриональных стволовых клетках и в раннем эмбрионе, но подавляются в большинстве соматических тканей (Sciamanna et al., 2013). Как правило, они играют важную роль в индивидуальных вариациях генома посредством инсерционного мутагенеза и изменения последовательности, которые могут приводить к генетическим заболеваниям.

Накопленные данные говорят о том, что изменение L1 вызывается многочисленными и разнообразными факторами внешней среды, например химическими веществами, ионизирующим, неионизирующим излучением. В связи с этим в настоящее время большое внимание уделяется экспозиционной парадигме, которая предполагает, что воздействие факторов окружающей среды на здоровье следует оценивать с учетом эндогенных процессов, например, активации L1, возникающей в результате биологической реакции на воздействие этих факторов (Del, Giorgi, 2020; Chénaïs, 2022). Воздействие стрессоров, химических и физических канцерогенов может привести к активации транспозонов. Активация ретроэлементов, в свою очередь, может влиять на экспрессию онкогенов и генов опухолевой супрессии, вызывать геномную нестабильность, способствующую комплексным геномным перестройкам, которые часто наблюдаются в злокачественных опухолях (Мустафин, Хуснутдинова, 2017).

Вопрос о роли модификации m6A мРНК в активации ретротранспозиции L1 и во взаимодействии ретроэлементов с геномом хозяина недостаточно изучен. Однако установлено, что мРНК многих классов ретроэлементов, в частности интронных L1, высокометилированы. При этом m6A усиливает экспрессию L1, способствуя их ретротранспозиции (Xiong et al., 2021). Это согласуется с тем, что различные клеточные стрессы индуцируют перераспределение m6A по всему транскриптому, приводя к увеличению числа мРНК, содержащих 5'-UTR m6A. Наличие 5'-UTR m6A делает возможной трансляцию без 5' кэп-связывающих белков, способствуя успешной трансляции при стрессах (Meyer et al.,

2015). Модификация m6A в мРНК L1 влияет на весь цикл репликации L1, его ретротранспозицию, на экспрессию соседних генов с последующим влиянием на стабильность генома, самообновление клеток и потенциал дифференцировки, что играет важную роль в развитии человека в норме и при патологических процессах (Zhang A. et al., 2024). Примечательно, что m6A регулирует стабильность мРНК L1 и/или транскрипцию с помощью множества механизмов. Решающее значение в определении стабильности мРНК принадлежит относящимся к «считывателям» каноническим белкам (YTHDF) и неканоническим белкам (IGF2BP). YTHDF в основном способствуют деградации мРНК различными цитоплазматическими путями, тогда как функция IGF2BP заключается в поддержании стабильности мРНК. Помимо того, YTHDC1 функционирует в ядре, разрушая или защищая определенные m6A-содержащие мРНК (Wei, 2024).

Маркированные m6A интронные L1 (MIL) являются эволюционно молодым классом L1, ориентированы на гены хозяина и ассоциированы с десятком РНК-связывающих белков, включая белок ядерного матрикса SAFB. MIL иногда действуют как транскрипционные «барьеры», препятствующие экспрессии генов хозяина. Функционируя как регуляторные элементы, m6A-маркированные интроны L1 преимущественно подавляют транскрипцию генов человека. С другой стороны, показано, что YTHDF2 распознает m6A-модифицированные ретротранспозоны L1 и разрушает мРНК L1 посредством аутофагии, тем самым блокируя ретротранспозицию L1. Более того, установлено, что m6A модификация в зародышевых клетках плода человека способствует деградации ретротранспозонной мРНК L1, предотвращая встраивание новых ретротранспозонов L1 в геном хозяина (Li Z. et al., 2024). Полученные результаты позволяют предполагать, что управляемое m6A взаимодействие L1 с геномом хозяина играет важную роль в целостности генома, регуляции экспрессии генов, процессах дифференцировки и деления клеток в норме и при патологических состояниях (Xiong et al., 2021).

Роль m6A в онкогенезе во взаимосвязях между модифицированной РНК и метилированием ДНК

В 2019 г. R. Xiao с коллегами, систематически исследовав геномную активность десятков РНК-связывающих белков в хроматине клеточных линий HepG2 и K562, выдвинули идею о том, что транскрипция и котранскрипционный процессинг РНК – это не просто события, совпадающие в пространстве и времени, а их «более механистическая интеграция» (Li X., Fu, 2019; Xiao et al., 2019). Взаимодействие модификации РНК с эпигенетической регуляцией в контексте хроматина выяснилось в результате ряда исследований. Было обнаружено, что m6A встречается в ассоциированных с хроматином РНК (chromosome-associated RNA, caRNA), включая промотор-ассоциированную РНК (paRNA), энхансерную РНК (eRNA) и РНК, транскрибируемую из повторяющихся элементов (repeat RNA), которые, в свою очередь, влияют на окружение хроматина и транскрипцию (Li Y. et al., 2020; Liu J. et al., 2020; Xu et al., 2021). Снижение метилирования m6A за счет истощения METTL3 или сайт-специфичного деметилирова-

ния т6А определенных саRNA повышает уровень саRNA и способствует открытому состоянию хроматина и последующей транскрипции.

В последние годы накоплены данные о сложном взаимодействии между т6А и другими хорошо изученными эпигенетическими модификациями, включая модификации гистонов и метилирование ДНК. Эти перекрестные связи играют решающую роль в формировании такого состояния хроматина, которое необходимо для точной и специфической настройки экспрессии генов, и, несомненно, оказывают глубокое влияние как на физиологические, так и на патологические процессы (Wang Y. et al., 2024). В работе (Deng S. et al., 2022) охарактеризован механизм регуляции доступности хроматина и транскрипции генов, опосредованный метилированием РНК по аденозину в сочетании с деметилированием ДНК по метилированному цитозину. В пользу наличия перекрестных связей между модификациями т6А РНК и ДНК-5-метилцитозин (ДНК-5mC) говорит также то, что «считыватель» РНК N6-метиладенозина, YTHDC2, рекрутирует и активирует ДНК-5mC-деметилазу (TET1) в районы ретро-транспозонов LTR7 для удаления 5mC из этих районов посредством деметилирования ДНК (Sun T. et al., 2023). Кроме того, «записывание» меток т6А РНК определяется котранскрипционными модификациями гистонов, и, в свою очередь, т6А РНК регулирует формирование локального метилирования ДНК-5mC или гистоновых меток (Huang H. et al., 2019; Li Y. et al., 2020).

Установлено, что саRNA участвуют в регуляции экспрессии генов посредством множества механизмов и играют важную роль в развитии различных типов опухолей (Tang et al., 2023). В зависимости от того, какой белок саRNA присоединяет к хроматину, может происходить стимулирование или ингибирование прогрессирования опухоли. При этом важное значение в развитии опухолей имеет метилирование саRNA. Существенная роль в онкогенезе принадлежит также регуляции транскрипции, связанной с образованием R-петли при удержании зарождающегося РНК-транскрипта в РНК:ДНК гетеродуплексе. Аберрантное накопление гибридов ДНК:РНК, вызывающих повреждение ДНК и нестабильность генома, связано со многими онкогенными мутациями и нарушением регуляции экспрессии (Costantino, Koshland, 2018; Abakir, Ruzov, 2024). Установлено, что аномальное накопление R-петель, вызванное потерей опухолевого супрессора, способствует прогрессированию опухоли (Mosler et al., 2021). Модификация т6А в зарождающихся РНК влияет на образование R-петель (Abakir et al., 2020). Истощение METTL3 резко снижает образование R-петли и нарушает терминацию транскрипции, а модификация т6А, созданная METTL3 на зарождающихся РНК, может увеличить образование R-петель в терминаторных областях гена и способствовать терминации транскрипции (Yang X. et al., 2019).

Таким образом, выявляются сложные взаимосвязи, происходящие между т6А и другими известными эпигенетическими модификациями. Эти взаимосвязи способствуют запуску эпигенетического ремоделирования, оказывая дальнейшее воздействие на различные физиологические и патологические процессы, в частности на возникновение опухоли (Zhao et al., 2021).

Роль модификации т6А РНК в ангиогенезе опухоли

В физиологических условиях в норме ангиогенез регулируется различными цитокинами и участвует в эмбриональном развитии, заживлении ран, репродукции и менструальном цикле (Ma Q. et al., 2020). Патологический ангиогенез представляет собой неконтролируемый процесс, который приводит к различным заболеваниям (Jeong et al., 2021).

Ангиогенез является основным признаком опухолей, который формируется преимущественно в результате генетической мутации или эпигенетических изменений (Hanahan, Weinberg, 2011). Солидные опухоли, как правило, растут вокруг кровеносных сосудов и не могут превышать объем 2 мм³ без васкуляризации (Folkman, 1971; De Heer et al., 2020). Неоваскуляризация опухоли обеспечивает поступление достаточного количества кислорода и питательных веществ, необходимых для устойчивого роста опухоли, ее инвазии и метастазирования. Индукция «ангиогенного переключения» зависит от баланса ангиогенных и антиангиогенных факторов. Смещение баланса в сторону ангиогенных факторов приводит к переходу от неоваскуляризированной гиперплазии к растущей васкуляризированной опухоли и к прогрессированию опухоли. Этот процесс является фактором, который ограничивает скорость экспоненциального роста опухоли (Bergers, Benjamin, 2003; Baeriswyl, Christofori, 2009; Hanahan, Weinberg, 2011).

Модификация т6А мРНК участвует в регуляции ангиогенеза как при физиологических, так и при патологических состояниях. В патологическом ангиогенезе аномальная экспрессия модифицирующих мРНК регуляторов способствует ангиогенезу опухоли, влияя на статус мРНК ангиогенных факторов и других белков (Chen et al., 2022). Производимое METTL3 образование т6А РНК играет важную роль в ангиогенезе при реакции на гипоксический стресс, регулируя передачу сигналов по Wnt сигнальному пути посредством модификации генов-мишеней (Yao et al., 2020). Как указывалось ранее, гипоксия характерна для микроокружения опухоли. В условиях гипоксии фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) стимулирует деление и пролиферацию эндотелиальных клеток, что приводит к образованию новых капилляров. Клетки гладкой мускулатуры сосудов, фибробласты и иммунные клетки тоже секретируют ангиогенные факторы (Schwartz, Mitchell, 1962; Noonan et al., 2008; Newman et al., 2011). Прямые ангиогенные факторы тесно взаимосвязаны и совместно участвуют в формировании сосудистой сети в опухолях (Viallard, Larrivée, 2017). Недостаток VEGF приводит к гибели эмбриона в ходе беременности, в то время как избыточная экспрессия VEGF способствует ангиогенезу опухоли (Melincovici et al., 2018). При многих типах опухолей избыточная экспрессия METTL3 усиливает ангиогенез за счет активации онкогенов (Wang Q. et al., 2020).

По результатам анализа геномной онтологии, низкая экспрессия FTO («ластик», снижающий уровень т6А в транскриптом) коррелирует с плотностью микрососудов при холангиокарциноме, что связано с плохим прогнозом (Rong et al., 2019). При гепатоцеллюлярной карциноме модификация т6А мРНК YAP1, влияя на трансляцию мРНК YAP1, играет ключевую роль в образовании васкулогенной мимикрии

(Qiao et al., 2023). При колоректальном раке METTL3 также участвует в формировании васкулогенной мимикрии, что способствует развитию опухоли (Liu X. et al., 2022).

Высокая экспрессия METTL3 при остеогенезе активирует сигнальный путь PI3K/AKT в эндотелиальных клетках-предшественниках, усиливая их рост и, в конечном счете, способствуя ангиогенезу (Jiang et al., 2021). Мезенхимальные стволовые клетки костного мозга при высокой экспрессии METTL3 секретируют фактор роста эндотелия, способствующий локальному ангиогенезу, а подавление METTL3 приводит к снижению экспрессии этого фактора (Tian et al., 2019), что свидетельствует о влиянии METTL3 на регуляцию его экспрессии. Следует отметить, что существующие сегодня противоангиогенные стратегии борьбы с метастазами рака в первую очередь направлены на сигнальный путь фактора роста эндотелия сосудов VEGF или его рецептора (VEGFR). В связи с этим METTL3 и YAP1, которые снижают образование васкулогенной мимикрии, могут быть потенциальными терапевтическими мишенями (Qiao et al., 2021).

Заключение

Модификация т6А РНК модулирует метаболизм РНК, влияя на многие физиологические процессы, включая онкогенез, самообновление и ангиогенез. Функции модификации т6А РНК в этих процессах в основном определяются регуляторами т6А, которые распознают, добавляют или удаляют сайты, модифицированные т6А. Для регуляции клеточных процессов в развитии опухоли важны как общий уровень, так и распределение т6А в масштабах транскриптома, что в значительной мере определяет двойственный характер влияния модификации т6А мРНК на возникновение и прогрессию злокачественной опухоли. Однако на количество и функции т6А РНК при различных типах опухолей, помимо регуляторов, могут влиять такие факторы, как онкопротеин, фактор транскрипции и фактор передачи сигнала. Кроме того, роль белков-регуляторов в развитии злокачественных опухолей представляется сложной: одна и та же модификация т6А РНК может оказывать совершенно противоположное действие при различных типах опухолей. К тому же основной «записывающий» фермент METTL3 выполняет также независимые от каталитической активности функции, способствуя трансляции генов-мишеней. Все это осложняет выяснение молекулярных механизмов участия производимой METTL3 модификации т6А РНК в онкогенезе и выявление мишеней, которые могут быть использованы в терапии опухолей.

Одной из важных стратегий противоопухолевой терапии является снижение уровня ангиогенеза. Для этого разработаны многие препараты, но, несмотря на достижения, такой подход дает лишь временное преимущество (YuYan, Yuan, 2024). В связи с этим представляется перспективным анализ уровня экспрессии метилтрансферазы METTL3 для разработки методов диагностики и прогноза развития ряда опухолей, а также использование ингибиторов этого фермента для подавления ангиогенеза в качестве терапевтического подхода. Дальнейшие исследования необходимы для определения новых стратегий лечения злокачественных новообразований и разработки противоопухолевых препаратов.

Список литературы / References

- Мустафин Р.Н., Хуснутдинова Э.К. Эпигенетика канцерогенеза. *Креативная хирургия и онкология*. 2017;7(3):60-64. doi 10.24060/2076-3093-2017-7-3-60-67
- [Mustafin R.N., Khusnutdinova E.K. Epigenetics of carcinogenesis. *Kreativnaya Hirurgiya i Onkologiya = Creative Surgery and Oncology*. 2017;7(3):60-64. doi 10.24060/2076-3093-2017-7-3-60-67 (in Russian)]
- Abakir A., Giles T.C., Cristini A., Foster J.M., Dai N., Starczak M., Rubio-Roldan A., Li M., Eleftheriou M., Crutchley J., Flatt L., Young L., Gaffney D.J., Denning C., Dalhus B., Emes R.D., Gackowski D., Corrèa I.R., Garcia-Perez J.L., Klungland A., Gromak N., Ruzov A. N⁶-methyladenosine regulates the stability of RNA:DNA hybrids in human cells. *Nat. Genet.* 2020;52(1):48-55. doi 10.1038/s41588-019-0549-x
- Abakir A., Ruzov A. A model for a dual function of N⁶-methyladenosine in R-loop regulation. *Nat. Genet.* 2024;56(10):1995-1998. doi 10.1038/s41588-024-01905-5
- Aguilo F., Zhang F., Sancho A., Fidalgo M., Di Cecilia S., Vashisht A., Lee D.F., Chen C.H., Rengasamy M., Andino B., Jahouh F., Roman A., Krig S.R., Wang R., Zhang W., Wohlschlegel J.A., Wang J., Walsh M.J. Coordination of m⁶A mRNA methylation and gene transcription by ZFP217 regulates pluripotency and reprogramming. *Cell Stem Cell*. 2015;17(6):689-704. doi 10.1016/j.stem.2015.09.005
- Baeriswyl V., Christofori G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.* 2009;19(5):329-337. doi 10.1016/j.semcancer.2009.05.003
- Baylin S.B., Jones P.A. A decade of exploring the cancer epigenome – biological and translational implications. *Nat. Rev. Cancer*. 2011;11(10):726-734. doi 10.1038/nrc3130
- Bergers G., Benjamin L.E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer*. 2003;3(6):401-410. doi 10.1038/nrc1093
- Bertero A., Brown S., Madrigal P., Osnato A., Ortmann D., Yiangou L., Kadiwala J., Hubner N.C., de Los Mozos I.R., Sadée C., Lenaerts A.S., Nakanoh S., Grandy R., Farnell E., Ule J., Stunnenberg H.G., Mendjan S., Vallier L. The SMAD2/3 interactome reveals that TGFβ controls m⁶A mRNA methylation in pluripotency. *Nature*. 2018;555(7695):256-259. doi 10.1038/nature25784
- Boccaletto P., Machnicka M.A., Purta E., Piatkowski P., Baginski B., Wirecki T.K., de Crécy-Lagard V., Ross R., Limbach P.A., Kotter A., Helm M., Bujnicki J.M. MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2017 update. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D303-D307. doi 10.1093/nar/gkx1030
- Boroughs L.K., DeBerardinis R.J. Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nat. Cell Biol.* 2015;17(4):351-359. doi 10.1038/ncb3124
- Cai X., Wang X., Cao C., Gao Y., Zhang S., Yang Z., Liu Y., Zhang X., Zhang W., Ye L. HBXIP-elevated methyltransferase METTL3 promotes the progression of breast cancer via inhibiting tumor suppressor let-7g. *Cancer Lett.* 2018;415:11-19. doi 10.1016/j.canlet.2017.11.018
- Chen H., Yao J., Bao R., Dong Y., Zhang T., Du Y., Wang G., Ni D., Xun Z., Niu X., Ye Y., Li H.B. Cross-talk of four types of RNA modification writers defines tumor microenvironment and pharmacogenomic landscape in colorectal cancer. *Mol. Cancer*. 2021;20(1):29. doi 10.1186/s12943-021-01322-w
- Chen H.M., Li H., Lin M.X., Fan W.J., Zhang Y., Lin Y.T., Wu S.X. Research progress for RNA modifications in physiological and pathological angiogenesis. *Front. Genet.* 2022;13:952667. doi 10.3389/fgene.2022.952667
- Chénais B. Transposable elements and human diseases: mechanisms and implication in the response to environmental pollutants. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(5):2551. doi 10.3390/ijms23052551
- Costantino L., Koshland D. Genome-wide map of R-loop-induced damage reveals how a subset of R-loops contributes to genomic instability. *Mol. Cell*. 2018;71(4):487-497.e3. doi 10.1016/j.molcel.2018.06.037
- de Heer E.C., Jalving M., Harris A.L. HIFs, angiogenesis, and metabolism: elusive enemies in breast cancer. *J. Clin. Invest.* 2020;130(10):5074-5087. doi 10.1172/JCI137552
- Del Re B., Giorgi G. Long INterspersed element-1 mobility as a sensor of environmental stresses. *Environ. Mol. Mutagen.* 2020;61(4):465-493. doi 10.1002/em.22366
- Deng S., Zhang J., Su J., Zuo Z., Zeng L., Liu K., Zheng Y., Huang X., Bai R., Zhuang L., Ye Y., Li M., Pan L., Deng J., Wu G., Li R., Zhang S., Wu C.,

- Lin D., Chen J., Zheng J. RNA m⁶A regulates transcription via DNA demethylation and chromatin accessibility. *Nat. Genet.* 2022;54(9):1427-1437. doi 10.1038/s41588-022-01173-1
- Deng X., Su R., Weng H., Huang H., Li Z., Chen J. RNA N⁶-methyladenosine modification in cancers: current status and perspectives. *Cell Res.* 2018;28(5):507-517. doi 10.1038/s41422-018-0034-6
- Dominissini D., Moshitch-Moshkovitz S., Schwartz S., Salmon-Divon M., Ungar L., Osenberg S., Cesarkas K., Jacob-Hirsch J., Amariglio N., Kupiec M., Sorek R., Rechavi G. Topology of the human and mouse m⁶A RNA methylomes revealed by m⁶A-seq. *Nature.* 2012;485(7397):201-206. doi 10.1038/nature11112
- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 1971;285(21):1182-1186. doi 10.1056/NEJM197111182852108
- Garraway L.A., Lander E.S. Lessons from the cancer genome. *Cell.* 2013;153(1):17-37. doi 10.1016/j.cell.2013.03.002
- Gu Y., Wu X., Zhang J., Fang Y., Pan Y., Shu Y., Ma P. The evolving landscape of N⁶-methyladenosine modification in the tumor microenvironment. *Mol. Ther.* 2021;29(5):1703-1715. doi 10.1016/j.jymthe.2021.04.009
- Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674. doi 10.1016/j.cell.2011.02.013
- He L., Li J., Wang X., Ying Y., Xie H., Yan H., Zheng X., Xie L. The dual role of N⁶-methyladenosine modification of RNAs is involved in human cancers. *J. Cell. Mol. Med.* 2018;22(10):4630-4639. doi 10.1111/jcmm.13804
- He L., Li H., Wu A., Peng Y., Shu G., Yin G. Functions of N⁶-methyladenosine and its role in cancer. *Mol. Cancer.* 2019;18(1):176. doi 10.1186/s12943-019-1109-9
- Hess M.E., Hess S., Meyer K.D., Verhagen L.A., Koch L., Brönneke H.S., Dietrich M.O., Jordan S.D., Saletore Y., Elemento O., Belgardt B.F., Franz T., Horvath T.L., Rütger U., Jaffrey S.R., Kloppenburg P., Brüning J.C. The fat mass and obesity associated gene (*Fto*) regulates activity of the dopaminergic midbrain circuitry. *Nat. Neurosci.* 2013;16(8):1042-1048. doi 10.1038/nn.3449
- Huang H., Weng H., Zhou K., Wu T., Zhao B.S., Sun M., Chen Z., Deng X., Xiao G., Auer F., Klemm L., Wu H., Zuo Z., Qin X., Dong Y., Zhou Y., Qin H., Tao S., Du J., Liu J., Lu Z., Yin H., Mesquita A., Yuan C.L., Hu Y.C., Sun W., Su R., Dong L., Shen C., Li C., Qing Y., Jiang X., Wu X., Sun M., Guan J.L., Qu L., Wei M., Müschen M., Huang G., He C., Yang J., Chen J. Histone H3 trimethylation at lysine 36 guides m⁶A RNA modification co-transcriptionally. *Nature.* 2019;567(7748):414-419. doi 10.1038/s41586-019-1016-7
- Jeong J.H., Ojha U., Lee Y.M. Pathological angiogenesis and inflammation in tissues. *Arch. Pharm. Res.* 2021;44(1):1-15. doi 10.1007/s12272-020-01287-2
- Jia G., Fu Y., Zhao X., Dai Q., Zheng G., Yang Y., Yi C., Lindahl T., Pan T., Yang Y.G., He C. N⁶-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat. Chem. Biol.* 2011;7(12):885-887. doi 10.1038/nchembio.687. (Erratum in: *Nat. Chem. Biol.* 2012;8(12):1008)
- Jiang W., Zhu P., Huang F., Zhao Z., Zhang T., An X., Liao F., Guo L., Liu Y., Zhou N., Huang X. The RNA methyltransferase METTL3 promotes endothelial progenitor cell angiogenesis in mandibular distraction osteogenesis via the PI3K/AKT pathway. *Front. Cell. Dev. Biol.* 2021;9:720925. doi 10.3389/fcell.2021.720925
- Li H.B., Tong J., Zhu S., Batista P.J., Duffy E.E., Zhao J., Bailis W., Cao G., Kroehling L., Chen Y., Wang G., Broughton J.P., Chen Y.G., Kluger Y., Simon M.D., Chang H.Y., Yin Z., Flavell R.A. m⁶A mRNA methylation controls T cell homeostasis by targeting the IL-7/STAT5/SOCS pathways. *Nature.* 2017;548(7667):338-342. doi 10.1038/nature23450
- Li M., Zha X., Wang S. The role of N⁶-methyladenosine mRNA in the tumor microenvironment. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer.* 2021;1875(2):188522. doi 10.1016/j.bbcan.2021.188522
- Li X., Fu X.D. Chromatin-associated RNAs as facilitators of functional genomic interactions. *Nat. Rev. Genet.* 2019;20(9):503-519. doi 10.1038/s41576-019-0135-1
- Li Y., Xia L., Tan K., Ye X., Zuo Z., Li M., Xiao R., Wang Z., Liu X., Deng M., Cui J., Yang M., Luo Q., Liu S., Cao X., Cao X., Zhu H., Liu T., Hu J., Shi J., Xiao S., Xia L. N⁶-methyladenosine co-transcriptionally directs the demethylation of histone H3K9me2. *Nat. Genet.* 2020;52(9):870-877. doi 10.1038/s41588-020-0677-3
- Li Z., Fang F., Zafar M.I., Wu X., Liu X., Tan X., Luo J., Ye Z., Xiong C., Li H. RNA m⁶A modification regulates L1 retrotransposons in human spermatogenic stem cell differentiation in vitro and in vivo. *Cell. Mol. Life Sci.* 2024;81(1):92. doi 10.1007/s00018-024-05119-0
- Liu J., Dou X., Chen C., Chen C., Liu C., Xu M.M., Zhao S., Shen B., Gao Y., Han D., He C. N⁶-methyladenosine of chromosome-associated regulatory RNA regulates chromatin state and transcription. *Science.* 2020;367(6477):580-586. doi 10.1126/science.aay6018
- Liu Q., Gregory R.I. RNAmoD: an integrated system for the annotation of mRNA modifications. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(W1):W548-W555. doi 10.1093/nar/gkz479
- Liu X., He H., Zhang F., Hu X., Bi F., Li K., Yu H., Zhao Y., Teng X., Li J., Wang L., Zhang Y., Wu Q. m⁶A methylated EphA2 and VEGFA through IGF2BP2/3 regulation promotes vasculogenic mimicry in colorectal cancer via PI3K/AKT and ERK1/2 signaling. *Cell Death Dis.* 2022;13(5):483. doi 10.1038/s41419-022-04950-2
- Liu Y., Liu Z., Tang H., Shen Y., Gong Z., Xie N., Zhang X., Wang W., Kong W., Zhou Y., Fu Y. The N⁶-methyladenosine (m⁶A)-forming enzyme METTL3 facilitates M1 macrophage polarization through the methylation of *STAT1* mRNA. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2019;317(4):C762-C775. doi 10.1152/ajpcell.00212.2019
- Ma Q., Reiter R.J., Chen Y. Role of melatonin in controlling angiogenesis under physiological and pathological conditions. *Angiogenesis.* 2020;23(2):91-104. doi 10.1007/s10456-019-09689-7
- Ma Y., Xu X., Wang H., Liu Y., Piao H. Non-coding RNA in tumor-infiltrating regulatory T cells formation and associated immunotherapy. *Front. Immunol.* 2023;14:1228331. doi 10.3389/fimmu.2023.1228331
- Melinovicic C.S., Boşca A.B., Şuşman S., Mărginean M., Miha C., Istrate M., Moldovan I.M., Roman A.L., Miha C.M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) – key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom. J. Morphol. Embryol.* 2018;59(2):455-467
- Meyer K.D., Saletore Y., Zumbo P., Elemento O., Mason C.E., Jaffrey S.R. Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell.* 2012;149(7):1635-1646. doi 10.1016/j.cell.2012.05.003
- Meyer K.D., Patil D.P., Zhou J., Zinoviev A., Skabkin M.A., Elemento O., Pestova T.V., Qian S.B., Jaffrey S.R. 5' UTR m⁶A promotes cap-independent translation. *Cell.* 2015;163(4):999-1010. doi 10.1016/j.cell.2015.10.012
- Mosler T., Conte F., Longo G.M.C., Mikicic I., Kreim N., Möckel M.M., Petrosino G., Flach J., Barau J., Luke B., Roukos V., Beli P. R-loop proximity proteomics identifies a role of DDX41 in transcription-associated genomic instability. *Nat. Commun.* 2021;12(1):7314. doi 10.1038/s41467-021-27530-y
- Newman A.C., Nakatsu M.N., Chou W., Gershon P.D., Hughes C.C. The requirement for fibroblasts in angiogenesis: fibroblast-derived matrix proteins are essential for endothelial cell lumen formation. *Mol. Biol. Cell.* 2011;22(20):3791-3800. doi 10.1091/mbc.E11-05-0393
- Noonan D.M., De Lerma Barbaro A., Vannini N., Mortara L., Albin A. Inflammation, inflammatory cells and angiogenesis: decisions and indecisions. *Cancer Metastasis Rev.* 2008;27(1):31-40. doi 10.1007/s10555-007-9108-5
- Panneerdoss S., Eedunuri V.K., Yadav P., Timilsina S., Rajamanickam S., Viswanadhappalli S., Abdelfattah N., Onyeagucha B.C., Cui X., Lai Z., Mohammad T.A., Gupta Y.K., Huang T.H., Huang Y., Chen Y., Rao M.K. Cross-talk among writers, readers, and erasers of m⁶A regulates cancer growth and progression. *Sci. Adv.* 2018;4(10):eaar8263. doi 10.1126/sciadv.aar8263
- Qiao K., Liu Y., Xu Z., Zhang H., Zhang H., Zhang C., Chang Z., Lu X., Li Z., Luo C., Liu Y., Yang C., Sun T. RNA m⁶A methylation promotes the formation of vasculogenic mimicry in hepatocellular carcinoma via Hippo pathway. *Angiogenesis.* 2021;24(1):83-96. doi 10.1007/s10456-020-09744-8. (Erratum in: *Angiogenesis.* 2023;26(1):197-199. doi 10.1007/s10456-022-09857-2)
- Robertson K.D. DNA methylation and human disease. *Nat. Rev. Genet.* 2005;6(8):597-610. doi 10.1038/nrg1655
- Rong Z.X., Li Z., He J.J., Liu L.Y., Ren X.X., Gao J., Mu Y., Guan Y.D., Duan Y.M., Zhang X.P., Zhang D.X., Li N., Deng Y.Z., Sun L.Q. Downregulation of fat mass and obesity associated (*Fto*) promotes the progression of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Front. Oncol.* 2019;9:369. doi 10.3389/fonc.2019.00369

- Schwartz C.J., Mitchell J.R. Cellular infiltration of the human arterial adventitia associated with atheromatous plaques. *Circulation*. 1962;26:73-78. doi 10.1161/01.cir.26.1.73
- Sciamanna I., Gualtieri A., Cossetti C., Osimo E.F., Ferracin M., Macchia G., Aricò E., Prosseda G., Vitullo P., Misteli T., Spadafora C. A tumor-promoting mechanism mediated by retrotransposon-encoded reverse transcriptase is active in human transformed cell lines. *Oncotarget*. 2013;4(12):2271-2287. doi 10.18632/oncotarget.1403
- Su W., Che L., Liao W., Huang H. The RNA m⁶A writer METTL3 in tumor microenvironment: emerging roles and therapeutic implications. *Front. Immunol.* 2024;15:1335774. doi 10.3389/fimmu.2024.1335774
- Sun T., Xu Y., Xiang Y., Ou J., Soderblom E.J., Diao Y. Crosstalk between RNA m⁶A and DNA methylation regulates transposable element chromatin activation and cell fate in human pluripotent stem cells. *Nat. Genet.* 2023;55(8):1324-1335. doi 10.1038/s41588-023-01452-5
- Sun Y., Shen W., Hu S., Lyu Q., Wang Q., Wei T., Zhu W., Zhang J. METTL3 promotes chemoresistance in small cell lung cancer by inducing mitophagy. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2023;42(1):65. doi 10.1186/s13046-023-02638-9
- Tang J., Wang X., Xiao D., Liu S., Tao Y. The chromatin-associated RNAs in gene regulation and cancer. *Mol. Cancer*. 2023;22(1):27. doi 10.1186/s12943-023-01724-y
- Tian C., Huang Y., Li Q., Feng Z., Xu Q. Mettl3 regulates osteogenic differentiation and alternative splicing of Vegfa in bone marrow mesenchymal stem cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(3):551. doi 10.3390/ijms20030551
- Tong J., Wang X., Liu Y., Ren X., Wang A., Chen Z., Yao J., Mao K., Liu T., Meng F.L., Pan W., Zou Q., Liu J., Zhou Y., Xia Q., Flavell R.A., Zhu S., Li H.B. Pooled CRISPR screening identifies m⁶A as a positive regulator of macrophage activation. *Sci. Adv.* 2021;7(18):eabd4742. doi 10.1126/sciadv.abd4742
- Viallard C., Larrivé B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*. 2017;20(4):409-426. doi 10.1007/s10456-017-9562-9
- Wang P., Doxtader K.A., Nam Y. Structural basis for cooperative function of Mettl3 and Mettl14 methyltransferases. *Mol. Cell*. 2016;63(2):306-317. doi 10.1016/j.molcel.2016.05.041
- Wang Q., Chen C., Ding Q., Zhao Y., Wang Z., Chen J., Jiang Z., Zhang Y., Xu G., Zhang J., Zhou J., Sun B., Zou X., Wang S. METTL3-mediated m⁶A modification of HDGF mRNA promotes gastric cancer progression and has prognostic significance. *Gut*. 2020;69(7):1193-1205. doi 10.1136/gutjnl-2019-319639
- Wang S., Chai P., Jia R., Jia R. Novel insights on m⁶A RNA methylation in tumorigenesis: a double-edged sword. *Mol. Cancer*. 2018;17(1):101. doi 10.1186/s12943-018-0847-4
- Wang X.S., He J.R., Yu S., Yu J. [Methyltransferase-like 3 promotes the proliferation of acute myeloid leukemia cells by regulating N⁶-methyladenosine levels of MYC]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*. 2018;40(3):308-314. doi 10.3881/j.issn.1000-503X.2018.03.002 (in Chinese)
- Wang Y., Li Y., Toth J.I., Petroski M.D., Zhang Z., Zhao J.C. N⁶-methyladenosine modification destabilizes developmental regulators in embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* 2014;16(2):191-198. doi 10.1038/ncb2902
- Wang Y., Huang H., Chen J., Weng H. Crosstalk between histone/DNA modifications and RNA N⁶-methyladenosine modification. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2024;86:102205. doi 10.1016/j.gde.2024.102205
- Wei G. RNA m⁶A modification, signals for degradation or stabilisation? *Biochem. Soc. Trans.* 2024;52(2):707-717. doi 10.1042/BST20230574
- Xiao R., Chen J.Y., Liang Z., Luo D., Chen G., Lu Z.J., Chen Y., Zhou B., Li H., Du X., Yang Y., San M., Wei X., Liu W., Lécuyer E., Graveley B.R., Yeo G.W., Burge C.B., Zhang M.Q., Zhou Y., Fu X.D. Pervasive chromatin-RNA binding protein interactions enable RNA-based regulation of transcription. *Cell*. 2019;178(1):107-121.e18. doi 10.1016/j.cell.2019.06.001
- Xiong F., Wang R., Lee J.H., Li S., Chen S.F., Liao Z., Hasani L.A., Nguyen P.T., Zhu X., Krakowiak J., Lee D.F., Han L., Tsai K.L., Liu Y., Li W. RNA m⁶A modification orchestrates a LINE-1-host interaction that facilitates retrotransposition and contributes to long gene vulnerability. *Cell Res*. 2021;31(8):861-885. doi 10.1038/s41422-021-00515-8
- Xu W., Li J., He C., Wen J., Ma H., Rong B., Diao J., Wang L., Wang J., Wu F., Tan L., Shi Y.G., Shi Y., Shen H. METTL3 regulates heterochromatin in mouse embryonic stem cells. *Nature*. 2021;591(7849):317-321. doi 10.1038/s41586-021-03210-1
- Yang X., Liu Q.L., Xu W., Zhang Y.C., Yang Y., Ju L.F., Chen J., Chen Y.S., Li K., Ren J., Sun Q., Yang Y.G. m⁶A promotes R-loop formation to facilitate transcription termination. *Cell Res*. 2019;29(12):1035-1038. doi 10.1038/s41422-019-0235-7
- Yang Z., Jiang X., Li D., Jiang X. HBXIP promotes gastric cancer via METTL3-mediated MYC mRNA m⁶A modification. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(24):24967-24982. doi 10.18632/aging.103767
- Yao M.D., Jiang Q., Ma Y., Liu C., Zhu C.Y., Sun Y.N., Shan K., Ge H.M., Zhang Q.Y., Zhang H.Y., Yao J., Li X.M., Yan B. Role of METTL3-dependent N⁶-methyladenosine mRNA modification in the promotion of angiogenesis. *Mol. Ther.* 2020;28(10):2191-2202. doi 10.1016/j.jymthe.2020.07.022
- Yu Yan, Yuan E. Regulatory effect of N⁶-methyladenosine on tumor angiogenesis. *Front. Immunol.* 2024;15:1453774. doi 10.3389/fimmu.2024.1453774
- Zhang A., Cen S., Li X.Y. N⁶-adenosine methylation and the regulatory mechanism on LINE-1. *Yi Chuan*. 2024;46(3):209-218. doi 10.16288/j.ycz.23-248
- Zhang B., Wu Q., Li B., Wang D., Wang L., Zhou Y.L. m⁶A regulator-mediated methylation modification patterns and tumor microenvironment infiltration characterization in gastric cancer. *Mol. Cancer*. 2020;19(1):53. doi 10.1186/s12943-020-01170-0
- Zhao Y., Chen Y., Jin M., Wang J. The crosstalk between m⁶A RNA methylation and other epigenetic regulators: a novel perspective in epigenetic remodeling. *Theranostics*. 2021;11(9):4549-4566. doi 10.7150/thno.54967
- Zheng G., Dahl J.A., Niu Y., Fedorcsak P., Huang C.M., Li C.J., Vågbo C.B., Shi Y., Wang W.L., Song S.H., Lu Z., Bosmans R.P., Dai Q., Hao Y.J., Yang X., Zhao W.M., Tong W.M., Wang X.J., Bogdan F., Furu K., Fu Y., Jia G., Zhao X., Liu J., Krokan H.E., Klungland A., Yang Y.G., He C. ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Mol. Cell*. 2013;49(1):18-29. doi 10.1016/j.molcel.2012.10.015

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 09.10.2024. После доработки 05.12.2024. Принята к публикации 09.12.2024.

 pismavavilov.ru

DOI 10.18699/letvjgb-2024-10-26

Оригинальное исследование

Оптимизация параметров биобаллистики для трансформации мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. линии Велют

М.А. Нестеров ^{1,2} ✉, А.А. Киселёва ^{1,2}, Е.М. Тимонова ^{1,2}, Е.М. Сергеева ^{1,2}, Е.А. Салина ^{1,2}

Аннотация: Для улучшения хозяйственно ценных признаков мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) весьма перспективно геномное редактирование, а биобаллистический метод – один из наиболее распространенных способов доставки генетических конструкций. Большая часть опубликованных работ по редактированию мягкой пшеницы выполнена с использованием нескольких модельных сортов. Показано, что эффективность трансформации – генотип-специфичный показатель, поэтому подбор условий для успешной трансформации немодельных генотипов является актуальной задачей. В работе проведено сравнение эффективности биобаллистики для трансформации зародышевых щитков мягкой пшеницы линии Велют при варьировании следующих параметров: материал и концентрация микрокаристов (20, 40 мг/мл для золотых микрокаристов и 50 мг/мл для вольфрамовых), давление гелия (650 и 1100 psi). Эффективность биобаллистики оценивали по среднему числу клеток, экспрессирующих репортерный ген белка eGFP, на эксплант. Результаты показали, что при использовании частиц вольфрама как при 650 psi, так и 1100 psi, а также частиц золота при 1100 psi и 40 мг/мл эффективность трансформации снижается из-за усиления повреждения тканей щитков. Наибольшая эффективность бомбардировки отмечена для микрокаристов золота при следующих сочетаниях параметров: концентрация частиц 20 мг/мл и давление 1100 psi либо 40 мг/мл и давление 650 psi.

Ключевые слова: трансформация; биобаллистика; пшеница; линия Велют; зародышевые щитки.

Для цитирования: Нестеров М.А., Киселёва А.А., Тимонова Е.М., Сергеева Е.М., Салина Е.А. Оптимизация параметров биобаллистики для трансформации мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. линии Велют. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;10(4):224-230. DOI 10.18699/letvjgb-2024-10-26

Финансирование: Исследование выполнено за счет бюджетных средств FWNR-2024-0009.

Original article

Optimization of bioballistic parameters for transformation of common wheat *Triticum aestivum* L. line Velut

М.А. Nesterov ^{1,2} ✉, А.А. Kiseleva ^{1,2}, Е.М. Timonova ^{1,2}, Е.М. Sergeeva ^{1,2}, Е.А. Salina ^{1,2}

Abstract: Genome editing is a promising method for improving agronomic valuable traits in bread wheat (*Triticum aestivum* L.), with the bioballistic method being one of the most common techniques for delivering genetic constructs. Most published studies on editing bread wheat have used a few model varieties. However, transformation efficiency has been shown to be genotype-dependent, making it essential to optimize conditions for successful transformation of non-model genotypes. In this study, we compared the effectiveness of biobalistics for transforming immature scutellum of the common wheat line Velut using various parameters: the type and concentration of microcarriers (20, 40 mg/ml for gold microparticles and 50 mg/ml for tungsten) and helium pressure (650 and 1100 psi). Transformation efficiency was evaluated by the average number of eGFP-expressing cells per explant. It was concluded from the results obtained that transformation efficiency decreased when using tungsten particles at both 650 psi and 1100 psi, as well as gold particles at 1100 psi and 40 mg/mL, due to increased scutellum damage. This study demonstrated that the highest transformation efficiency was achieved using gold microcarriers with the following parameter combinations: a particle concentration of 20 mg/ml at 1100 psi, or 40 mg/ml at 650 psi.

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 the ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia

 mikkanestor@bionet.nsc.ru

 Нестеров М.А., Киселёва А.А., Тимонова Е.М., Сергеева Е.М., Салина Е.А., 2024

Key words: transformation; biobalistic; wheat; line Velut; immature scutellum.

For citation: Nesterov M.A., Kiseleva A.A., Timonova E.M., Sergeeva E.M., Salina E.A. Optimization of biobalistic parameters for transformation of common wheat *Triticum aestivum* L. line Velut. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;10(4):224-230. DOI 10.18699/letvjgb-2024-10-26 (in Russian)

Funding: Исследование выполнено за счет бюджетных средств FWNR-2024-0009.

Введение

Мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L., $2n = 6x = 42$, AABBDD) – одна из наиболее значимых сельскохозяйственных культур. Изменения климата и, следовательно, условий возделывания растений, а также растущие продовольственные потребности делают актуальной задачу создания сортов пшеницы с улучшенными сельскохозяйственными и адаптивными признаками. Для ускорения этого процесса применяют маркер-опосредованную селекцию, однако более перспективной технологией, позволяющей воздействовать целенаправленно на определенные гены, считаются подходы геномного редактирования с использованием, например, системы CRISPR-Cas (Chen et al., 2019). Один из ключевых моментов методик геномного редактирования в частности и геномной инженерии в целом – доставка чужеродных нуклеиновых кислот (ДНК плазмид, экспрессирующих кассет) либо рибонуклеопротеиновых комплексов в растительную клетку.

Для двудольных растений успешно используют перенос генетического материала с помощью агробактерий, метод не требует дорогостоящего оборудования и дает стабильные результаты. Однако для растений из класса однодольных, в частности семейства злаковые (Poaceae Barnh.), применение агробактериальной трансформации ограничено по ряду причин: в целом менее эффективная регенерация *in vitro*, уровень которой сильно зависит от генотипа; отсутствие природной восприимчивости однодольных к агробактериям. Успешные результаты агробактериальной трансформации показаны для отдельных сортов пшеницы и ячменя (Wan, Lemaux, 1994; Cheng et al., 1997).

Более эффективен и менее зависим от генотипа метод трансформации пшеницы «биобаллистика», при котором осуществляется прямое попадание экзогенного генетического материала в растительную клетку. Суть метода заключается в бомбардировке эксплантов с помощью прибора, называемого генная пушка, золотыми либо вольфрамовыми микрочастицами диаметром 0.6–1.6 мкм с иммобилизованными на них плазмидными векторами. Первые трансгенные растения пшеницы были получены именно с помощью биобаллистики (Vasil et al., 1992).

Эффективность этого метода зависит от большого количества факторов, к которым относятся как биологические (тип экспланта, условия культивирования и регенерации), так и физические, влияющие непосредственно на доставку экзогенной ДНК в клетки: материал и размер микрочастиц, параметры работы генной пушки (Jones, 2005). С начала применения метода биобаллистики появилось много исследовательских работ, в которых тестируют влияние различных параметров как по отдельности, так и в сочетании, и разработаны протоколы, применяемые для широкого спектра сортов (Altpeter et al., 1996; Zhang et al., 2015).

Для трансформации пшеницы часто используют тип экспланта, называемый незрелый зародышевый щиток, – специализированная ткань, которая представляет собой видоизмененную ось зародыша, а также эмбриогенные каллусы, образованные из щитков. В первых работах были задействованы эмбриогенные каллусы (Vasil et al., 1992). Применение непосредственно щитков в качестве экспланта позволяет ускорить процесс трансформации пшеницы (Wang et al., 2022). Для ускорения идентификации трансформантов используют также конструкции, экспрессирующие репортерные гены, например *gfp* (green fluorescence protein) (Pang et al., 1996).

В первых работах, посвященных биобаллистике злаковых, описана экспрессия репортерного гена в клетках зародышей с помощью частиц вольфрама (Lonsdale et al., 1990). Микрочастицы вольфрама дешевле и более доступны, чем частицы золота, и широко применяются при трансформации каллусов пшениц (Miroshnichenko et al., 2007, 2011, 2018, 2020; Tian et al., 2018). В большом количестве последующих исследований показано, что предпочтительными носителями ДНК служат частицы золота диаметром 0.6 мкм (Ismagul et al., 2018), при этом частицы 1 мкм так же эффективны (Rasco-Gaunt et al., 1999; Yao et al., 2007; Hamada et al., 2017; Wang et al., 2022).

В целом, задача оптимизации методики состоит в нахождении баланса между эффективностью бомбардировки микрочастицами и вызванными ею разрушениями используемого типа тканей. Хотя успех трансформации при применении метода биобаллистики меньше зависит от генотипа, чем при использовании агробактерий (Altpeter et al., 2016), в ряде исследований показаны пятикратные различия в эффективности доставки ДНК в клетки и трансформации в зависимости от сорта пшеницы, при следовании одинаковому протоколу (Rasco-Gaunt et al., 2001; Fadeev et al., 2006; Souza et al., 2015; Wang et al., 2022). Таким образом, подбор параметров бомбардировки для конкретного генотипа (сорта, линии) остается актуальной задачей.

Линия яровой мягкой пшеницы Велют, ее подробная родословная представлена в (Berezhnaya et al., 2021), обладает таким хозяйственно ценным признаком, как устойчивость к полеганию, но имеет длительный вегетационный период (91–104 сут) (Агеева и др., 2021, 2023). Линия Велют обладает также хорошей регенерационной способностью, что делает ее отличным объектом для геномного редактирования (Miroshnichenko et al., 2019). Таким образом, перспективной задачей является сокращение сроков колошения этой линии, которое может быть достигнуто методами геномной инженерии. Цель работы – подбор эффективных параметров биобаллистики для трансформации зародышевых щитков мягкой пшеницы линии Велют. Для этого мы оценивали совокупное влияние трех варьирующихся параметров:

материал микрочастиц (золото, вольфрам), концентрация микрочастиц (20, 40 мг/мл для золотых и 50 мг/мл для вольфрамовых микрочастиц), а также давление гелия (650 и 1100 psi) – на уровень экспрессии репортерного гена в зародышевых щитках.

Материалы и методы

Растительный материал и приготовление эксплантов

Растения пшеницы линии Велют выращивали в сосудах в контролируемых условиях климатической камеры Fitotron SGR 121 (Weiss Technik UK Ltd., Великобритания). Первые шесть недель растения выращивали при 12-часовом световом дне и температуре 18 °С днем/15 °С ночью, влажность 70 %, после – при 16-часовом дне и температуре 21 °С днем/18 °С ночью, влажность 70 %.

Колосья с завязавшимися зернами срезали в периоде между 14–16 днями после оплодотворения. Стерилизацию зерновок и выделение незрелых зародышей проводили в асептических условиях. Для стерилизации зерновки помещали в 70 % этанол на 1 мин, а затем в раствор хлорсодержащего коммерческого отбеливателя (50 % раствор Domestos) на 10 мин при осторожном перемешивании и после этого пять раз промывали стерильной водой. Незрелые зародыши размером 1–2 мм изолировали, удаляли аксис и помещали щитком вверх на среду для индукции каллуса WCIM (Sparks, Doherty, 2020) на двое суток в темноту при температуре 24 °С в термостате TC-1/80 СПУ (Россия). Для подготовки к процедуре бомбардировки зародышевые щитки в той же ориентации в количестве 30 штук распределяли, формируя круг диаметром 2.0–2.5 см в один слой ближе к центру чашки Петри со средой MS с витаминами, содержащей дополнительно 0.4 М маннита, и культивировали в темноте при температуре 26 °С в течение 4–6 ч до процедуры баллистики и 16 ч после. После этого экспланты помещали на среду WCIM для роста каллуса по 30 штук на чашку Петри диаметром 9 см.

Иммобилизация ДНК на микрочастицах

В качестве микронесителей использовали частицы золота диаметром 1 мкм (BioRad, США) либо вольфрамовые микрочастицы M17 (медианный размер частицы 1.1 мкм)

(BioRad, США). Для оценки эффективности трансформации был использован вектор 35S-eGFP-*nosT*, который содержит ген флюоресцирующего белка eGFP под промотором CaMV35S, предназначенный для транзientной экспрессии этого белка в клетках растений (Fujii, Kodama, 2015). Вектор предоставлен проф. Yutaka Kodama (Addgene plasmid # 80127; <http://n2t.net/addgene:80127>; RRID:Addgene_80127). Иммобилизацию плазмиды на микрочастицы в количестве 1 мкг/на выстрел осуществляли согласно стандартному протоколу (Sanford et al., 1993) с использованием CaCl₂/спермидина.

Бомбардировка эксплантов

Бомбардировку эксплантов микрочастицами проводили в стерильных условиях с помощью генной пушки Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System (Bio-Rad, США) по стандартному протоколу из руководства к использованию (PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery System Instruction Manual).

Расстояние от останавливающего экрана (stopping screen) до чашки Петри было фиксированным и составляло 6 см. Тестировали следующие варьирующиеся параметры: материал микрочастиц (золото 1 мкм и вольфрам M17), концентрации микрочастиц (для золота 40 и 20 мг/мл, для вольфрама 50 мг/мл), разрывные диски для давления гелия 650 и 1100 psi. Обстрел каждой чашки проводился по два раза.

В качестве контроля использовались две чашки Петри с эксплантами, одна из которых была обстреляна частицами золота в концентрации 40 мг/мл без плазмиды, а вторая – с интактными (необстрелянными) щитками.

Микроскопия и обработка полученных результатов

Через 24 ч инкубирования эксплантов в темноте при температуре 24 °С в термостате TC-1/80 СПУ (Россия) оценивали первичное общее состояние щитков с помощью световой микроскопии, без оценки интенсивности флюоресценции. Еще через 24 ч проводили оценку флюоресценции. Уровень экспрессии гена *eGFP* определяли по количеству точек флюоресценции в каждом щитке индивидуально. Оценка количества точек флюоресценции (показатель, который отражает произошедшее событие трансформации) проведена индивидуально для каждого щитка на каждой чашке Петри, затем данные по каждому сочетанию параметров суммиро-

Таблица 1. Рассчитанное количество точек флюоресценции в листовых щитках пшеницы линии Велют при сочетании разных параметров биобаллистики: материал частиц золото (Au) или вольфрам (W), концентрация частиц 20, 40, 50 мг/мл; давление гелия 650 или 1100 psi

Table 1. The number of fluorescence spots in the scutellum of the common wheat line Velut was calculated for various combinations of biobalistic parameters: particle material (gold (Au) or tungsten (W)), particle concentration (20, 40, 50 mg/ml), and helium pressure (650 or 1100 psi)

Параметр эксперимента	Количество эксплантов, штук	Суммарное количество точек флюоресценции	Среднее количество точек флюоресценции/эксплант	Стандартная ошибка среднего (SEM)
Au20/650 psi	46	255	5.5	1.64
Au20/1100 psi	46	4775	103.8	8.92
Au40/650 psi	48	4285	89.3	8.79
Au40/1100 psi	50	2944	58.9	8.95
W50 /650 psi	46	996	21.65	2.88
W50/1100 psi	54	2895	53.6	4.83

Таблица 2. Достоверность различий количества точек флюоресценции/щиток между отдельными экспериментами. В ячейках указаны числовые значение *p*-value при расчете по критерию Тьюки–Крамера

Table 2. Significance of differences in the number of fluorescent spots per scutellum between individual experiments. The cells display *p*-values calculated using the Tukey–Kramer test

Параметр эксперимента	Au20/650 psi	Au20/1100 psi	Au40/650 psi	Au40/1100 psi	W50/650 psi
Au20/650 psi	–	–	–	–	–
Au20/1100 psi	1.248e-10	–	–	–	–
Au40/650 psi	1.248e-10	0.6632	–	–	–
Au40/1100 psi	8.917e-7	0.0000622	0.01849	–	–
W50/650 psi	0.5677	1.248e-10	4.212e-10	0.001753	–
W50/1100 psi	0.0000088	0.000002904	0.002137	0.9927	0.01003

вали. Для расчета флюоресценции брали те щитки, которые входили целиком в поле зрения микроскопа при фотографировании. Суммарное количество проанализированных щитков для каждого набора параметров отражено в табл. 1. Оценку проводили на флюоресцентном микроскопе ZEISS SteREO Discovery.V8 с использованием зеленого фильтра (GFP WB) в программе ZEN 3.1.

Фотографические изображения щитков обрабатывали в следующем порядке: для первичной разметки точек флюоресценции использовали программу LabelMe (Russell et al., 2008; Wada, 2021). Количество точек флюоресценции подсчитывали с помощью бота DLgram, использующего машинное обучение (Matveev et al., 2024). Данные по количеству точек флюоресценции были объединены в таблицы Microsoft Excel, статическая обработка ANOVA проведена с использованием расширенного пакета Excel для анализа данных, достоверность различий при попарных сравнениях рассчитана с помощью апостериорного критерия Тьюки–Крамера. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

Результаты и обсуждение

Для выбора оптимального типа частиц и их концентрации, а также давления гелия для выстрела, подходящих для трансформации тканей незрелых зародышей мягкой пшеницы линии Велют, был проведен эксперимент, в котором сравнивали эффективность трансформации в следующих комбинациях параметров: (1) микрочастицы золота Au 20 мг/мл при давлении гелия 650 psi, (2) микрочастицы золота Au 20 мг/мл при давлении гелия 1100 psi, (3) микрочастицы золота Au 40 мг/мл при давлении гелия 650 psi, (4) микрочастицы золота Au 40 мг/мл при давлении гелия 1100 psi, (5) микрочастицы вольфрама W 50 мг/мл при давлении гелия 650 psi, (6) микрочастицы вольфрама W 50 мг/мл при давлении гелия 1100 psi (см. табл. 1).

В качестве двух контролей использовали «холостой» выстрел без частиц и выстрел частицами золота 40 мг/мл при давлении 1100 psi без плазмиды. При оценке общего состояния щитков ожидаемо наблюдали самые слабые повреждения тканей щитка при использовании концентрации частиц золота 20 мг/мл и давлении 650 и 1100 psi, а самые сильные – при использовании частиц вольфрама и давлении гелия 1100 psi.

Для определения эффективности биобаллистики мы оценили экспрессию репортерного гена *eGFP* в тканях незрелых зародышей. Суммарное количество проанализированных щитков для каждого набора параметров составило от 46 до 54 щитков для экспериментальных выстрелов и 20 и 22 щитка в контрольных чашках (см. табл. 1).

Эффективность трансформации плазмидой для каждой комбинации параметров отличается (рис. 1 и 2). Если сравнивать значения среднего количества точек флюоресценции/щиток, то наименьшее значение будет 5.5 точек при Au20 и 650 psi, а наибольшее – 103.8 точки при Au20 и 1100 psi. При этом наблюдается большой разброс (стандартная ошибка среднего) для каждого варианта.

Достоверность различия полученных данных оценена с помощью метода ANOVA и апостериорного критерия Тьюки–Крамера для попарных различий (см. рис. 2, табл. 2). Поскольку в предыдущих исследованиях, где рассматривали отдельное влияние размера микрочастиц и давления гелия (Hamada et al., 2017), показано, что оба фактора оказывают влияние комбинированно, принято решение рассматривать их влияние не по отдельности, а совместно.

При оценке количества точек флюоресценции показано отсутствие достоверных различий между следующими экспериментами: Au20/650 и W50/650; Au20/1100 и Au40/650; Au40/1100 и W50/1100 psi. Между оставшимися группами наблюдали достоверные различия. Наименьшая интенсивность экспрессии репортерного гена получена для сочетания параметров Au20/650 и W50/650 psi, средняя – при сочетании параметров Au40/1100 и W50/1100 psi, а наивысшая – при сочетании параметров Au20/1100 и Au40/650 psi.

При сравнении влияния параметров биобаллистики на эффективность трансформации в предыдущих исследованиях отмечено, что наиболее значимо давление гелия. Этот параметр определяет эффективность доставки частиц в клетки и степень разрушения тканей эксплантов (Chernobrovkina et al., 2007). Отсутствие достоверных различий при параметрах Au20/1100 и Au40/650 psi можно объяснить тем, что в этом случае увеличение давления гелия до 1100 psi делает более эффективной проникновение микрочастиц золота в клетки щитков, а увеличение количества золота в два раза, до 40 мг/мл, компенсирует более низкую эффективность доставки частиц в клетки при сниженном давлении гелия. При этом совместное действие давления

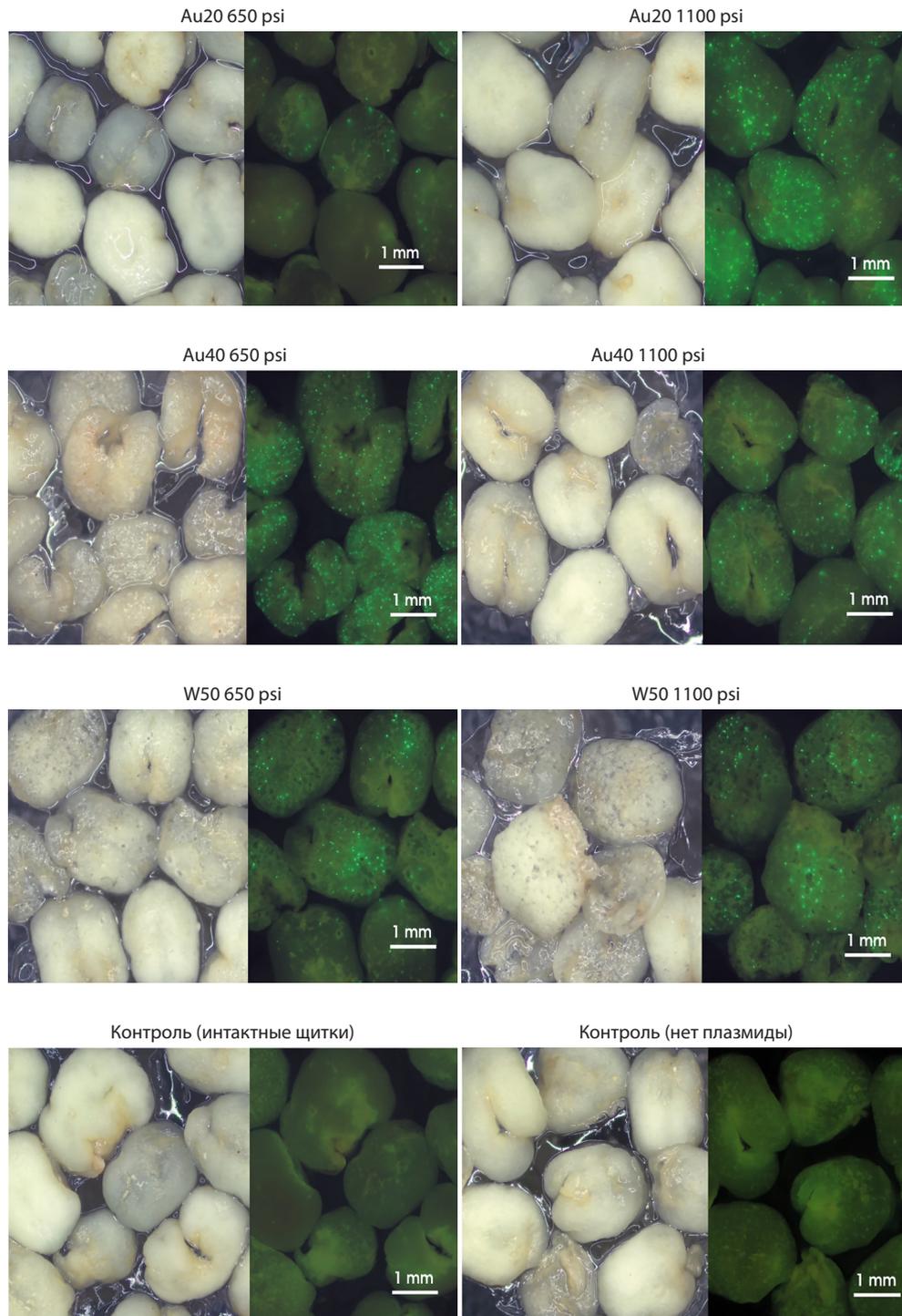


Рис. 1. Микроскопическое изображение щитков после проведенной процедуры биобаллистики. Надпись над каждой парой фотографий отображает сочетание параметров выстрела: Au20 – использованы частицы золота в концентрации 20 мг/мл, Au40 – частицы золота в концентрации 40 мг/мл, W50 – частицы вольфрама в концентрации 50 мг/мл; 650 и 1100 psi – разрывные диски для соответствующего давления гелия. Контрольный выстрел в отсутствии плазмиды проводился при параметрах Au40 и 1100 psi. Левая часть каждой пары фотографий: щитки при световой микроскопии, правая часть – флуоресцентная микроскопия с применением зеленого фильтра. Фотографии правой и левой частей сделаны одновременно

Fig. 1. Microscopic images of the scutellum following biobalistic treatment. The caption above each pair of photographs displays the combination of shot parameters: Au20 – gold particles at a concentration of 20 mg/ml, Au40 – gold particles at 40 mg/ml, W50 – tungsten particles at 50 mg/ml. The labels “650 psi” and “1100 psi” indicate the rupture disks corresponding to the helium pressure. A control shot using Au40 at 1100 psi was performed without a plasmid. In each pair, the left image shows the scutellum under light microscopy, while the right image shows fluorescence microscopy with a green filter. Both images were taken simultaneously

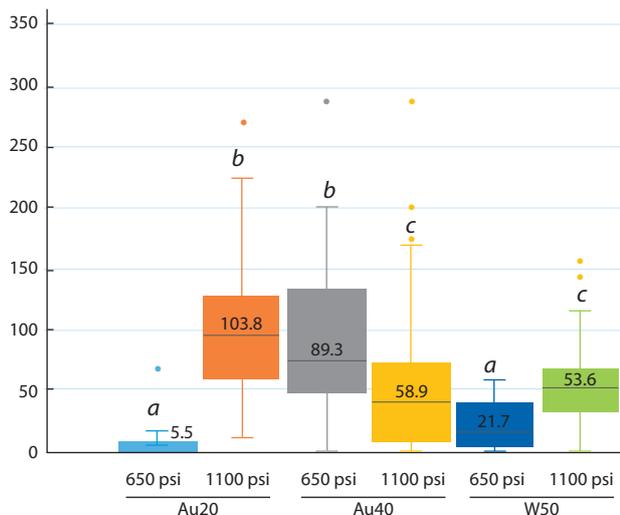


Рис. 2. Результаты статистического анализа ANOVA ($\alpha = 0.05$) для шести экспериментов с различающимися параметрами: материал микрочастиц, концентрация микрочастиц, давление гелия. В каждом ящике указано среднее значение точек флуоресценции на щиток. Величины, достоверно различающиеся при $p < 0.05$, обозначены буквами *a*, *b* и *c* над столбцами. Рассчитанные по критерию Тьюки–Крамера значения *p*-value представлены в табл. 2

Fig. 2. Results of the ANOVA statistical analysis ($\alpha = 0.05$) for six experiments with varying parameters (microcarrier material, microcarrier concentration, helium pressure). The mean number of fluorescence spots per scutellum is indicated in each box. Values that differ significantly ($p < 0.05$) are marked by the letters *a*, *b*, and *c* above the columns. The *p*-values calculated using the Tukey–Kramer test are shown in Table 2

1100 psi и концентрации частиц золота 40 мг/мл понижает эффективность трансформации, что, вероятно, связано с повышением разрушения тканей щитков.

Уровень экспрессии при трансформации частицами вольфрама можно отнести к наименьшему (при давлении 650 psi) и среднему (давление 1100 psi). Тот факт, что применение микрочастиц вольфрама менее эффективно при трансформации зародышевых щитков, объясним тем, что они вызывают большие разрушения тканей щитков (см. рис. 1), кроме того, вольфрам токсичен для тканей растений и вызывает двуцепочечные разрывы молекул ДНК, что может приводить к разрушению ДНК вектора при иммобилизации на частицы (Krysiak et al., 1999). Так, например, в работе М.А. Чернобровкиной и ее коллег (Chernobrovkina et al., 2007) при бомбардировке щитков ячменя частицами вольфрама экспрессия репортерного гена отсутствовала.

Заключение

В нашей работе подобраны оптимальные условия биобаллистики для бомбардировки щитков линии мягкой пшеницы Велут микрочастицами золота диаметром 1 мкм: концентрация 20 мг/мл при давлении гелия 1100 psi и концентрация 40 мг/мл при давлении гелия 650 psi. При этом целесообразнее использовать меньшую концентрацию частиц для удешевления эксперимента и минимизации повреждения ткани экспланта без потери эффективности трансформации.

Список литературы / References

- Ageeva E.V., Leonova I.N., Likhenco I.E., Sovetov V.V. Масса зерна колоса и масса тысячи зерен как признаки продуктивности у сортов яровой мягкой пшеницы разных групп спелости в условиях лесостепи Приобья. *Письма в Вавилонский журнал генетики и селекции*. 2021;7(1):5-11. doi 10.18699/Letters-VJ2021-7-01
- [Ageeva E.V., Leonova I.N., Likhenco I.E., Sovetov V.V. The ear grain weight and the thousand grain weight as productivity traits in varieties of spring bread wheat of different ripening groups in the conditions of the Priob'e steppe. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;7(1):5-11. doi 10.18699/LettersVJ2021-7-01 (in Russian)]
- Ageeva E.V., Leonova I.N., Salina E.A., Likhenco I.E. Изучение анатомо-морфологических признаков стебля и устойчивости к полеганию сортов яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). *Журнал Сибирского федерального университета. Серия: Биология*. 2023;16(4):506-521
- [Ageeva E.V., Leonova I.N., Salina E.A., Likhenco I.E. A study of morpho-anatomical traits and lodging resistance in spring bread wheat varieties (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Siberian Federal University. Biology*. 2023;16(4):506-521 (in Russian)]
- Altpeter F., Vasil V., Srivastava V., Stöger E., Vasil I.K. Accelerated production of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. *Plant Cell Rep.* 1996;16(1-2):12-17. doi 10.1007/BF01275440
- Altpeter F., Springer N.M., Bartley L.E., Blechl A.E., Brutnell T.P., Citovsky V., Conrad L.J., Gelvin S.B., Jackson D.P., Kausch A.P., Lemaux P.G., Medford J.I., Orozco-Cárdenas M.L., Tricoli D.M., Van Eck J., Voytas D.F., Walbot V., Wang K., Zhang Z.J., Stewart C.N. Jr. Advancing crop transformation in the era of genome editing. *Plant Cell*. 2016;28(7):1510-1520. doi 10.1105/tpc.16.00196
- Berezhnaya A., Kiseleva A., Leonova I., Salina E. Allelic variation analysis at the vernalization response and photoperiod genes in Russian wheat varieties identified two novel alleles of *Vrn-B3*. *Biomolecules*. 2021;11(12):1897. doi 10.3390/biom11121897
- Chauhan H., Khurana P. Wheat genetic transformation using mature embryos as explants. *Methods Mol. Biol.* 2017;1679:153-167. doi 10.1007/978-1-4939-7337-8_10
- 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
- Cheng M., Fry J.E., Pang S., Zhou H., Hironaka C.M., Duncan D.R., Conner T.W., Wan Y. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 1997;115(3):971-980. doi 10.1104/pp.115.3.971
- Chernobrovkina M.A., Sidorov E.A., Baranov I.A. The effect of the parameters of biolistic transformation of spring barley (*Hordeum vulgare* L.) on the level of transient expression of *GFP* reporter gene. *Biol. Bull.* 2007;34(6):558-563. doi 10.1134/S1062359007060040
- Fadeev V.S., Blinkova O.V., Gaponenko A.K. Optimization of biological and physical parameters for biolistic genetic transformation of common wheat (*Triticum aestivum* L.) using a particle inflow gun. *Russ. J. Genet.* 2006;42(4):402-411. doi 10.1134/S1022795406040077
- Fujii Y., Kodama Y. In planta comparative analysis of improved green fluorescent proteins with reference to fluorescence intensity and bimolecular fluorescence complementation ability. *Plant Biotech.* 2015;32(1):81-87. doi 10.5511/plantbiotechnology.15.0120a
- Hamada H., Linghu Q., Nagira Y. An *in planta* biolistic method for stable wheat transformation. *Sci. Rep.* 2017;7:11443. doi 10.1038/s41598-017-11936-0
- Ismagul A., Yang N., Maltseva E., Iskakova G., Mazonka I., Skiba Y., Bi H., Eliby S., Jatayev S., Shavrukov Y., Borisjuk N., Langridge P. A biolistic method for high-throughput production of transgenic wheat plants with single gene insertions. *BMC Plant Biol.* 2018;18:135. doi 10.1186/s12870-018-1326-1
- Jones H.D. Wheat transformation: current technology and applications to grain development and composition. *J. Cereal Sci.* 2005;41(2):137-147. doi 10.1016/j.jcs.2004.08.009
- Krysiak C., Mazuś B., Buchowicz J. Generation of DNA double-strand breaks and inhibition of somatic embryogenesis by tungsten microparticles in wheat. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1999;58:163-170. doi 10.1023/A:1006303331181

- Lonsdale D., Onde S., Cuming A. Transient expression of exogenous DNA in intact, viable wheat embryos following particle bombardment. *J. Exp. Bot.* 1990;41(9):1161-1165. doi 10.1093/jxb/41.9.1161
- Matveev A.V., Nartova A.V., Sankova N.N., Okunev A.G. DLgram cloud service for deep-learning analysis of microscopy images. *Microsc. Res. Tech.* 2024;87(5):991-998. doi 10.1002/jemt.24480
- Miroshnichenko D., Filippov M., Dolgov S. Genetic transformation of Russian wheat cultivars. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 2007;21(4):399-402. doi 10.1080/13102818.2007.10817482
- Miroshnichenko D.N., Poroshin G.N., Dolgov S.V. Genetic transformation of wheat using mature seed tissues. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2011;47:767-775. doi 10.1134/S0003683811080096
- Miroshnichenko D., Ashin D., Pushin A., Dolgov S. Genetic transformation of einkorn (*Triticum monococcum* L. ssp. *monococcum* L.), a diploid cultivated wheat species. *BMC Biotechnol.* 2018;18:68. doi 10.1186/s12896-018-0477-3
- Miroshnichenko D.N., Klementyeva A.A., Salina E.A., Dolgov S.V. Evaluation of *in vitro* plant regeneration efficiency in Siberian wheat cultivars. In: Current Challenges in Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology. Proceedings of the Fifth International Scientific Conference PlantGen-2019. Novosibirsk, 2019;126-128. doi 10.18699/ICG-PlantGen2019-40
- Miroshnichenko D., Klementyeva A., Pushin A., Dolgov S. A competence of embryo-derived tissues of tetraploid cultivated wheat species *Triticum dicoccum* and *Triticum timopheevii* for efficient and stable transgenesis mediated by particle inflow gun. *BMC Plant Biol.* 2020;20(Suppl. 1):442. doi 10.1186/s12870-020-02580-4
- Pang S.Z., DeBoer D.L., Wan Y., Ye G., Layton J.G., Neher M.K., Armstrong C.L., Fry J.E., Hinchee M.A., Fromm M.E. An improved green fluorescent protein gene as a vital marker in plants. *Plant Physiol.* 1996;112(3):893-900. doi 10.1104/pp.112.3.893
- PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery System Instruction Manual. [https://www.biorad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsl/literature/10000070900.pdf]
- Rasco-Gaunt S., Riley A., Barcelo P., Lazzeri P.A. Analysis of particle bombardment parameters to optimise DNA delivery into wheat tissues. *Plant Cell Rep.* 1999;19:118-127. doi 10.1007/s002990050721
- Rasco-Gaunt S., Riley A., Cannell M., Barcelo P., Lazzeri P.A. Procedures allowing the transformation of a range of European elite wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties via particle bombardment. *J. Exp. Bot.* 2001;52(357):865-874. doi 10.1093/jxb/52.357.865
- Russell B.C., Torralba A., Murphy K.P., Freeman W.T., LabelMe: a database and web-based tool for image annotation. *Int. J. Comput. Vis.* 2008;77(1-3):157-173. doi 10.1007/s11263-007-0090-8
- Sanford J.C., Smith F.D., Russell J.A. Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods Enzymol.* 1993;217:483-509. doi 10.1016/0076-6879(93)17086-k
- Souza C., Eduardo D., Fettig S., Ziegler P., Beck E. Transformation of an Argentine spring wheat genotype: optimization of the protocols for particle bombardment of excised immature embryos and rapid isolation of transgenic plants. *BAG. J. Basic Appl. Genet.* 2015;26(1):18-37
- Sparks C.A., Doherty A. Genetic transformation of common wheat (*Triticum aestivum* L.) using biolistics. *Methods Mol Biol.* 2020;2124:229-250. doi 10.1007/978-1-0716-0356-7_12
- Tian B., Navia-Urrutia M., Chen Y., Brungardt J., Trick H.N. Biolistic transformation of wheat. *Methods Mol. Biol.* 2018;1864:117-130. doi 10.1007/978-1-4939-8778-8_9
- Vasil V., Castillo A., Fromm M., Vasil I.K. herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Nat. Biotechnol.* 1992;10:667-674. doi 10.1038/nbt0692-667
- Wada K. Labelme: Image Polygonal Annotation with Python [Computer software]. 2021. doi 10.5281/zenodo.5711226
- Wan Y., Lemaux P.G. Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. *Plant Physiol.* 1994;104(1):37-48. doi 10.1104/pp.104.1.37
- Wang Y., Zeng J., Su P., Zhao H., Li L., Xie X., Zhang Q., Wu Y., Wang R., Zhang Y., Yu B., Chen M., Wang Y., Yang G., He G., Chang J., Li Y. An established protocol for generating transgenic wheat for wheat functional genomics via particle bombardment. *Front. Plant Sci.* 2022;13:979540. doi 10.3389/fpls.2022.979540
- Yao Q., Cong L., He G.Y., Chang J.L., Li K.X., Yang G.X. Optimization of wheat co-transformation procedure with gene cassettes resulted in an improvement in transformation frequency. *Mol. Biol. Rep.* 2007;34(1):61-67. doi 10.1007/s11033-006-9016-8
- Zhang K., Liu J., Zhang Y., Yang Z., Gao C. Biolistic genetic transformation of a wide range of Chinese elite wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties. *J. Genet. Genomics.* 2015;42(1):39-42. doi 10.1016/j.jgg.2014.11.005

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 30.09.2024. После доработки 05.11.2024. Принята к публикации 18.11.2024.

Сетевое издание «Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции» – реестровая запись СМИ Эл № ФС77-75536, зарегистрировано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций 08 мая 2019 г.

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.

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.

Сетевое издание «Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции» с 15.06.2023 включено в [Перечень рецензируемых научных изданий](#), в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, по специальностям и отраслям науки:

- 1.5.7. Генетика (биологические науки)
- 1.5.22. Клеточная биология (биологические науки)
- 4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология растений (биологические науки)
- 4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология растений (сельскохозяйственные науки)

Индексируется в РИНЦ, включено в DOAJ.

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

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

При перепечатке материалов ссылка на издание обязательна.

Учредитель и издатель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН)
Почтовый адрес учредителя и издателя: проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090
Почтовый 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: 20.12.2024