

# ГЕНЕТИКА ЖИВОТНЫХ И СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ. БИОЛОГИИ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ

УДК 575.224.22; 636.2.034

## АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ СПЛАЙСИНГ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТЬЮ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

**Бурсаков С.А., Ковалева А.В., Бригида А.В.**

Институт инновационных биотехнологий в животноводстве – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста»,  
г. Москва, Российская Федерация

*Достижения в области биотехнологии в селекционных программах, значительно упрощают оценку биоразнообразия и генетической изменчивости, влияющих на хозяйственно-полезные признаки поголовья крупного рогатого скота. В то же самое время, использование в отборе животных молекулярно-генетических маркеров способствует улучшению их генетического потенциала. Поэтому целью настоящей работы явилось биоинформатическое исследование генов-кандидатов, связанных с молочной продуктивностью крупного рогатого скота с целью выявления полиморфизмов в не кодирующих областях генома (интронах) и являющихся возможной причиной альтернативного сплайсинга. В будущем функциональный анализ позволит установить причинные связи между найденными вариантами-кандидатами и фенотипами, связанными с продуктивностью и качеством молока. **Ключевые слова:** альтернативный сплайсинг, однонуклеотидный полиморфизм, гены, молочное животноводство.*

## ALTERNATIVE SPLICING OF GENES ASSOCIATED WITH DAIRY PRODUCTIVITY OF CATTLE

**Bursakov S.A., Kovaleva A.V., Brigida A.V.**

The Institute of Innovative Biotechnologies in Livestock Breeding is a branch of the Federal State Budgetary Scientific Institution "Federal Research Center for Animal Husbandry – VIZh named after Academician L.K. Ernst, Moscow, Russia

*Advances in biotechnology in breeding programs have greatly simplified the assessment of biodiversity and genetic variability affecting economically beneficial traits in cattle. At the same time, the use of molecular genetic markers in the selection of animals contributes to the improvement of their genetic potential. Therefore, the purpose of this work was a bioinformatic study of candidate genes associated with the milk production of cattle in order to identify polymorphisms in non-coding regions of the genome (introns) and are a possible cause of alternative splicing. In the future, functional analysis will make it possible to establish causal relationships between the found candidate variants and phenotypes associated with milk productivity and quality. **Keywords:** alternative splicing, single nucleotide polymorphism, genes, dairy farming.*

**Введение.** В настоящее время значительная доля инновационных разработок в области молекулярной генетики крупного рогатого скота связано с однонуклеотидными полиморфизмами (SNP), представляющими собой мутацию одной пары основания в области сегмента ДНК, который кодирует определенный белок, или находится близко к нему. Знание функциональных мутаций, ответственных за фенотипические признаки является наиболее эффективным вариантом выбора маркеров. Их количество постоянно растет и насчитывает несколько сотен типов. Применение технологии с использованием маркеров в селекции позво-

ляет выявлять генетические дефекты и прогнозировать генетический потенциал продуктивности животных сразу после их рождения [1].

Для крупного рогатого скота известно уже более 300 генов, отвечающих за хозяйственно-полезные признаки или врожденные аномалии [2, 3]. На основе достижений молекулярной генетики разработаны эффективные методы идентификации генов-маркеров, которые определяют связь локусов количественных признаков с продуктивностью и заболеваниями животных.

Молочная продуктивность зависит от целого комплекса факторов и оценивается количеством и качеством молока, получаемого от коровы за определенный промежуток времени. Наследственные особенности и генетический потенциал животных играют при этом особую роль [4]. Высокопродуктивные животные, от которых можно получить молоко с большим содержанием жира и белка, обладающие хорошими технологическими свойствами – важная задача в селекции молочного животноводства [5, 6]. Между генетическим полиморфизмом и качеством молока млекопитающих была установлена взаимосвязь [7, 8].

Ввиду экзон-интронной структуры генов, кодирующих белок, их первичные транскрипты подвергаются сплайсингу – вырезанию интронов из матричной РНК-предшественницы (пре-мРНК) для трансформации в зрелую мРНК, состоящую только из экзонов. Этот процесс имеет место либо во время, либо сразу после транскрипции. Практически все гены, кодирующие белок, подвергаются сплайсингу, и их большинство подвергается альтернативному сплайсингу, с помощью которого экзоны могут быть сплайсированы по-разному [9], продуцируя множественные изоформы зрелой мРНК, транслируемые во множество белков. Альтернативный сплайсинг является ключевым элементом экспрессии эукариотических генов, который увеличивает кодирующую способность генома. Однако выбор неправильных сайтов сплайсинга может приводить к значительным нарушениям и в дальнейшем, заболеваниям человека и животных. Альтернативный сплайсинг является важным механизмом функциональной регуляции, достигая 21% генов, подвергающихся ему у крупного рогатого скота [10].

Выявление у крупного рогатого скота интронных последовательностей, влияющих на сплайсинг, не может ограничиваться только биоинформатическим анализом и всегда требует функционального анализа в модельной системе для четкого подтверждения варианта, вызывающего альтернативный сплайсинг и ведущий к возникновению изоформ, или не активных белковых молекул. Осуществление процедуры функционального анализа *in vitro* все еще достаточно нетривиально, трудоемко и затратно по времени. В связи с этим, пополнение баз данных о мутациях, локализованных вне кодирующих последовательностей и вызывающих патогенные мутации происходит достаточно медленно и не отражает в полной мере их обширное влияние на нарушение сплайсинга.

Поэтому целью настоящего исследования было обобщение литературной информации из баз данных о генах, сопряженных с лактирующей функцией КРС и биоинформатический анализ для выявления в них полиморфизмов наиболее вероятно приводящих к альтернативному сплайсингу.

**Материалы и методы исследований.** Нами были использованы базы данных генома, и программы для поиска и прогнозирования сайтов сплайсинга. В настоящее время согласно NCBI записи для *Bos taurus* герефордской породы известно три сборки генома: ARS-UCD1.2 (2018/04/11), Btau 5.0.1 (2015/11/19) и UMD 3.1.1 (2014/11/25) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), которыми мы пользовались в данном исследовании. Ensemble – (<https://www.ensembl.org/index.html>) – браузер генома для геномов позвоночных, который прогнозирует регуляторную функцию и собирает данные о заболеваниях. Европейский архив вариаций (EVA) (<https://www.ebi.ac.uk/eva/>) – это база данных, содержащая все типы данных о генетических вариациях многих видов. Предсказание сайтов сплайсинга выполняли с помощью NNSPLICE 0.9 ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)), а прогнозирование и поиск точки ветвления выполняли с помощью программного обеспечения SVM-BP ([http://regulatorygenomics.upf.edu/Software/SVM\\_BP/](http://regulatorygenomics.upf.edu/Software/SVM_BP/)). Оценку мутаций проводили с помощью Human splicing finder (<https://www.genomnis.com/the-system-1>).

**Результаты исследований.** Нами были выбраны четыре гена с установленной связью с молочной продуктивностью крупного рогатого скота. Краткая характеристика генов – кандидатов (LEPR, PRLR, AGPAT6, GHR) следующая.

LEPR ген, кодирующий белок, принадлежит к семейству цитокиновых рецепторов gp130 лептина, адипоцит-специфического гормона, регулирующего массу тела и участвующего в регуляции метаболизма жира, а также в новом кроветворном пути, который необходим для нормального лимфопоэза [11]. Для этого гена были описаны альтернативно сплайсированные варианты транскриптов, кодирующие различные изоформы.

PRLR, рецептор пролактина представляет собой рецептор цитокинов типа I, связывающий пролактин (PRL) как трансмембранный рецептор, а также может связываться и активироваться гормоном роста и плацентарным лактогеном человека (hPL). Экспрессия белка PRLR обнаруживается в клетках молочных желез [12] в соответствии с его ролью в лактации. Было обнаружено, что PRLR важен для лобулоальвеолярного созревания молочных желез во время беременности [13, 14], а также играет роль в жировой ткани, островковых клетках поджелудочной железы, пролиферация, и иммунных ответах.

AGPAT6, ген глицеролипид-ацилтрансферазы эндоплазматического ретикулума, в локусе 27 хромосомы, которая имеет решающее значение для производства молочного жира в молочной железе, а также дополнительные ассоциации для содержания жира, процентного количества белка и лактозы, объема молока и пропорций многочисленных жирных кислот молока.

GHR был идентифицирован как ген-кандидат, влияющий на производство молока и его качество у крупного рогатого скота. Ген, кодирующий белок трансмембранный рецептор гормона роста, принадлежит к семейству рецепторов цитокинов типа I. Связывание гормона роста с рецептором приводит к гомодимеризации рецептора и активации пути внутри- и межклеточной передачи сигнала, ведущего к росту. Ген участвует также в связывании протеинфосфатазы. Для этого гена было обнаружено множество альтернативно сплайсированных вариантов транскриптов. Известны две основные изоформы GHR относительно распространенные в большинстве популяций: полноразмерная изоформа (fl-GHR) и версия (d3-GHR), в которой отсутствует экзон 3, расположенный во внеклеточной области рецептора. GHR и PRLR являются паралогами.

Процесс отбора мутаций потенциально влияющих на сплайсинг состоял из их отбора в выбранных генах в сайтах сплайсинга или рядом с ними из баз данных и оценки значимости выбранной мутации, то есть вероятности того, что эта мутация приведёт к изменению транскрипта и как изменится в этих условиях экзон. Так как для разных сборок позиции элементов в геноме отличаются, то для каждой мутации все действия проводились с одной сборкой. Отбор мутаций вели с помощью баз данных EVA и Ensembl, а их оценка проводилась с помощью программы Human splicing finder.

В результате были определены мутации, потенциально влияющие на проявление альтернативного сплайсинга в отобранных генах крупного рогатого скота. Согласно структурной организации генов были найдены следующие мутации, которые могут быть причиной альтернативного сплайсинга: LEPR rs476543664 (3:79760505, T/A) акцепторный вариант сайта сплайсинга; rs456387982 (3:79760504, C/G) акцепторный вариант сайта сплайсинга; AGPAT6 (GPAT4) rs442541537 (27:36531205, G/A) интрон, донорный вариант сайта сплайсинга; PRLR rs717777704 (20:39098688, A/C) экзон, вариант с ошибкой ~ вариант области сплайсинга; GHR rs453832444 (20:31881438 A/T) интрон, донорный сайт сплайсинга.

**Закключение.** В ходе биоинформатического анализа были определены мутации, с высокой вероятностью связанные с альтернативным сплайсингом в интронной области генов LEPR, AGPAT6, GHR, и кодирующем экзоне PRLR. Их позиции соответствуют сайтам связывания и ответственны за нормальную работоспособность сплайсисом. В случае мутаций неадекватное взаимодействие сплайсисом с ДНК приводит к альтернативному сплайсингу. После подтверждения результатов биоинформатического анализа с использованием функционального анализа, выявленные однонуклеотидные полиморфизмы будут служить маркерами корректного функционирования альтернативного сплайсинга генов, ассоциированных с

молочной продуктивностью крупного рогатого скота и могут быть использованы в оценке племенных качеств животных и мониторинге популяций.

**Благодарности.** Исследования выполнены в рамках Государственного задания Минобрнауки России, тема № 121052600344-8.

**Литература** 1. Гончаренко, Г. М. Генетическая структура популяций сельскохозяйственных животных Западной Сибири и использование маркеров в селекции: автореф. дис. докт. биол. наук 06.02.01 / Г. М. Гончаренко. – Новосибирск, 2009. – 37 с. 2. Зиновьева, Н. А. Современные методы генетического контроля селекционных процессов и сертификация племенного материала в животноводстве: учебное пособие / Н. А. Зиновьева, П. М. Кленовицкий, С. А. Гладырь, А. А. Никишов – М. РУДН, 2008. – 329 с. 3. Калашиникова, Л. А. ДНК-технологии оценки сельскохозяйственных животных / Л. А. Калашиникова, И. М. Дунин, В. И. Глазко, Н. В. Рыжова, Е. П. Голубина. – Лесные Поляны [ВНИИплем], 1999. – 148 с. 4. Таранов, М. Т. Биохимия и продуктивность животных / М. Т. Таранов. – М. : Колос, 1976. – 240 с. 5. Ахметов, Т. М. Молочная продуктивность коров с разными генотипами бета-лактоглобулина / Т. М. Ахметов, С. В. Тюлькин, Э. Ф. Валиуллина // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана. – 2010. – Т. 202. – С. 31-36. 6. Хаертдинов, Р. А. Белки молока / Р. А. Хаертдинов, М. П. Афанасьев, Р. Р. Хаертдинов. – Казань : ИделПресс, 2009. – 256 с. 7. Shin, C. Cell signaling and control of pre-mRNA splicing. / C. Shin, J. L. Manley // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 2004. P. 727-738. 8. The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminant milks / P. Martin, M. Szymanowska, L. Zwierzchowski // Reprod Nutr Dev., 2002. 42(5). 433-459. 9. Blencowe, B. J. Альтернативный сплайсинг: новые идеи глобального анализа / B. J. Blencowe // Cell, 2006. 126, 37-47. 10. Chacko, E. Comprehensive splicing graph analysis of alternative splicing patterns in chicken, compared to human and mouse / E. Chacko, S Ranganathan // BMC Genomics 2009, 10 (Suppl 1). S 5. 11. Hill, R. Molecular markers located on the DGAT1, CAST, and LEPR genes and their associations with milk production and fertility traits in Holstein cattle / R. Hill, K. Bondioli, R. Morell, M. D. Garcia // Genet Mol Res., 2016. 15(1). 12. Brooks, C. L. Molecular mechanisms of prolactin and its receptor / C. L. Brooks // Endocrine Reviews., 2012. 33 (4). 504-525. 13. Triennial Lactation Symposium: Prolactin: The multifaceted potentiator of mammary growth and function / J. F. Trott, [et al.]. – Journal of Animal Science. 2012. 90 (5). 1674-1686. 14. Horseman ND Prolactin. Springer Science & Business Media. – 2012. – pp. 227.

УДК 636.13.082.2

## ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ ГЕНА MSTN У ЛОШАДЕЙ ТРАКЕНЕНСКОЙ И ГАННОВЕРСКОЙ ПОРОД

**Вишневец А.В., Будревич О.Л.**

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,  
г. Витебск, Республика Беларусь

*Представлены результаты исследования полиморфизма гена MSTN (миостатин) у лошадей тракененской и ганноверской пород. Наибольшая частота встречаемости аллеля T гена MSTN (0,682 и 0,571) генотипа MSTN<sup>CT</sup> (57,14 и 48,48 %) установлена у лошадей тракененской и ганноверской пород. **Ключевые слова:** спортивные лошади, ген MSTN, аллель, порода, частота встречаемости, генотип.*

## FREQUENCY OF THE MSTN GENE IN HORSES OF TRAKENEN AND HANNOVER BREEDS

**Vishnevets A.V., Budrevich A.L.**

Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus»

*The results of the study of MSTN gene polymorphism (myostatin) in Trakehner and Hanoverian horses are presented. The highest frequency of occurrence of the T allele of the MSTN gene (0.682 and 0.571) of the MSTN<sup>CT</sup> genotype (57.14 and 48.48%) was found in horses of the Trakenen and Hanoverian breeds. **Keywords:** sport horses, MSTN gene, allele, breed, frequency of occurrence, genotype.*