

УДК: 575.116.4: 575.2

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.4.453

ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНА *FSHR* У САМОК СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ (*RANGIFER TARANDUS*)

Крутикова А.А.^{1,2*} – канд. биол. наук, доц. каф. генетических и репродуктивных биотехнологий (ORCID 0000-0003-2561-145x); **Беликова А.О.**¹ – асп., преп. каф. генетических и репродуктивных биотехнологий (ORCID 0009-0006-9173-6129); **Пегливанян Г.К.**² – мл. науч. сотр. лаб. молекулярной генетики (ORCID 0000-0001-5194-4851); **Никиткина Е.В.**² – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. биологии развития (ORCID 0000-0002-8496-5277); **Мусидрай А.А.**³ – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. отд. жив-ва и рац. природопользования Арктики (0000-0002-0079-9938)

¹ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет
ветеринарной медицины»;

²Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения
сельскохозяйственных животных – филиал Федерального государственного бюджетного
научного учреждения «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ
имени академика Л. К. Эрнста»;

³ФГБУН «Санкт-Петербургский Федеральный исследовательский центр
РАН»,

* anntim2575@mail.ru

Ключевые слова: репродуктивные функции, олени, *FSHR*, SNP.

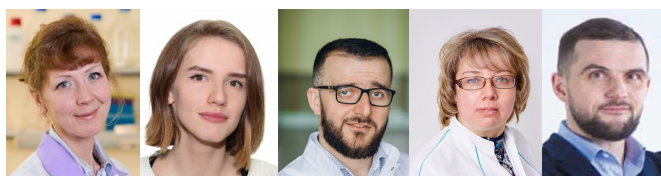
Key words: reproductive functions, reindeer, *FSHR*, SNP.

Финансирование: Исследование выполнено за счет гранта Российского науч-
ного фонда № 22-16-00085, <https://rscf.ru/project/22-16-00085/>

Поступила: 11.11.2024

Принята к публикации: 02.12.2024

Опубликована онлайн: 16.12.2024



РЕФЕРАТ

Оленеводство является важной отраслью животноводства в России, особенно в северных регионах страны, где климатические условия не всегда позволяют успешно разводить

другой вид скота. Наиболее перспективный вариант проведения селекционного процесса – геномная селекция представляет собой метод, основанный на анализе генетических данных о животных с целью выбора особей с определенными генетическими характеристиками и высоким племенным потенциалом для последующего разведения. Путем селекции по геномным данным можно повысить эффективность программ разведения, сократить время на получение желаемых результатов и улучшить качество потомства. Необходимым этапом становления геномной селекции является процесс поиска и отбора генов, ассоциированных с наиболее значимыми хозяйственно полезными признаками продуктивных животных. Кроме генов, влияющих на продуктивные качества, в селекции учитывают гены воспроизводительной функции животных. Так, ген *FSHR* (Follicle-

Stimulating Hormone Receptor) кодирует белок, который является рецептором для фолликулостимулирующего гормона (FSH), оказывающего разностороннее влияние на функционирование репродуктивной системы самцов и самок млекопитающих. Изучение гена *FSHR* имеет важное значение для понимания механизмов регуляции репродуктивной системы и поиска новых генетических маркеров, связанных с репродуктивными функциями у разных видов животных, в том числе северных оленей. Целью исследования являлось изучение полиморфизма гена *FSHR* у самок северного оленя Ямало-Ненецкого автономного округа Российской Федерации. Были исследованы образцы ДНК 43 самок северных оленей (*Rangifer tarandus*), принадлежащих к одному стаду. Нами был секвенирован участок гена *FSHR* длиной 2208 п.н., содержащий экзон 5. При исследовании участка нами было обнаружено два однонуклеотидных полиморфизма: G28578A и G29110A. Первый полиморфизм располагался во втором нуклеотиде кодона и вел к замене серина на аспарагин в аминокислотной последовательности белка. Второй полиморфизм был синонимичным и не приводил к изменению строения белка.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Оленеводство – стратегически значимая отрасль животноводства в России, обеспечивающая население регионов Крайнего Севера ценными продуктами животноводства. Олени являются ценным источником мяса, молока, шерсти и других продуктов, которые играют значительную роль в питании и экономике северных народов, используются как для внутреннего потребления, так и для экспорта. Помимо этого, оленеводство способствует сохранению биоразнообразия и традиционной культуры коренных народов, которые тесно связаны с этой отраслью животноводства, а также способствует развитию туризма и созданию рабочих мест в удаленных сельских районах севера [1-3].

Геномная селекция в животноводстве представляет собой метод, основанный на анализе генетических данных о животных с целью выбора особей с определенными высокоценными генетическими характеристиками для последующего разведения. Таким образом, геномная селекция представляет собой современный метод улучшения генетического потенциала животных путем анализа и отбора определенных генетических маркеров, ассоциированных со значимыми продуктивными и репродуктивными качествами. Одним из основных преимуществ геномной селекции является возможность ускорения процесса селекции, что позволяет сократить время и ресурсы, необходимые для разви-

тия новых пород или улучшения существующих. Путем селекции по геномным данным можно повысить эффективность программ разведения, сократить время на получение желаемых результатов и улучшить качество потомства.

Ген *FSHR* (Follicle-Stimulating Hormone Receptor) кодирует белок, который является рецептором для фолликулостимулирующего гормона (ФСГ). *FSHR* является членом семейства рецепторов гормонов, связанных с G-белком, и участвует в регуляции различных процессов в семенниках и яичниках. Ранее у различных видов животных уже были описаны мутации в гене *FSHR*, которые приводили как к повышению, так и снижению активности белка-рецептора, причем отмечалось, что наибольшее фенотипическое влияние изменения в последовательности гена оказывали именно на женский организм. Мутации, повышающие активность белка, придают рецептору фолликулостимулирующего гормона более высокую чувствительность к ФСГ, делая его конститутивно активным даже при отсутствии лиганда. Инактивирующие мутации снижают функцию рецептора вплоть до полного блокирования. Инактивирующие мутации *FSHR* могут приводить к снижению фертильности и преждевременному истощению яичников, тогда как активирующие мутации могут предрасполагать к синдрому гиперстимуляции яичников [4-7]. Изучение гена *FSHR* имеет важное значение для понима-

ния механизмов регуляции работы репродуктивной системы и поиска новых генетических маркеров, связанных с репродуктивными функциями у разных видов животных, в том числе северных оленей.

Целью исследования являлось изучение полиморфизма гена *FSHR* у самок северного оленя Ямало-Ненецкого автономного округа Российской Федерации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Были исследованы образцы ДНК 43 самок северных оленей (*Rangifer tarandus*), принадлежащих к одному стаду частного оленеводческого хозяйства в Ямало-Ненецком автономном округе. Кровь для выделения ДНК и измерения уровней половых гормонов (ФСГ, лютеинизирующий гормон (ЛГ), эстрадиол, прогестерон) отбиралась из яремной вены животных.

Гормональный статус важен для определения с применением иммуноферментного анализа на ИФА-спектрофотометре FlexA-200 «Allsheng» (КНР) при помощи коммерческих наборов «Алкор-Био» (Россия) (эстрадиол и прогестерон) и Cloud-Clone Corp. (КНР) (ЛГ).

Выделение ДНК производилось с помощью фенольного метода согласно стандартной методике с применением протеинкиназы K. Затем исследуемый участок гена *FSHR* был амплифицирован в реакционной смеси объемом 10 мкл, состоящей из 2 мкл 5x буфера для Taq (с содержанием 15Мм Mg²⁺), 0,2 мкл Taq-полимеразы («Сибэнзим», Новосибирск), 1,2 мкл смеси dNTP (2,5 мМ), 0,2 мкл каждого из праймеров, а также 0,2 мкл выделенной ДНК-матрицы и 6 мкл деионизированной воды. Последовательность праймеров, использованных для амплификации:

FSHR-F: 5'-AAC ATG GCT CCA TGC TGT GA-3'

FSHR-R: 5'-GGG GTA GGA AGG GAA ACA GC-3'

Подбор праймеров был осуществлен с помощью приложения Primer-BLAST международной базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Для под-

бора праймеров была использована референсная последовательность генома белохвостого оленя (*Odocoileus virginianus texanus*), в связи с её более высоким качеством относительно находящихся в данный момент в свободном доступе сборок генома северного оленя [5].

Таким образом, амплифицированный участок состоял из 2381 пары нуклеотидов и включал в себя последовательность 5-го экзона гена *FSHR*. Полученный фрагмент затем был секвенирован, для приготовления библиотек ДНК применяли набор «Rapid Sequencing Kit», для нанопорового секвенирования использовали прибор MinION (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания). Последовательности прочтений определяли с помощью программы MinKNOW (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания). Выравнивание прочтений секвенатора на референсную последовательность осуществляли с помощью программы Minimap2 (v.2.24). Последующий поиск однонуклеотидных полиморфизмов в фрагменте гена *FSHR* был осуществлён с помощью программы longshot (v. 1.0.0), с порогом фильтрации в 500 прочтений на SNP.

Частота встречаемости генотипов в исследованной выборке животных вычислялась по формуле:

$$p = n/N,$$

где p – частота определенного генотипа, n – число животных, обладающих данным генотипом, N – общее число животных.

Частота аллелей определялась по следующей формуле:

$$pA = (2nAA + nAB) : 2N,$$

где pA – частота аллеля A, n – число носителей определенного генотипа, N – суммарное число аллелей.

Ожидаемое число обладателей того или иного генотипа в исследуемой группе животных рассчитывали по закону Харди-Вайнберга. Сравнение наблюдаемых частот генотипов с частотой ожидаемых проводили с помощью критерия хи-квадрат (таблица 1). Критическое значение для отвержения нулевой гипотезы

принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Нами был секвенирован участок *FSHR* длиной 2208 п.н., содержащий пятый интрон гена у важенок полуострова Ямал. При исследовании участка нами было обнаружено два однонуклеотидных полиморфизма: G29110A и G28578A. Первый полиморфизм был синонимичным и не приводил к изменению строения белка. Второй полиморфизм располагался во втором нуклеотиде кодона и вел к замене серина на аспарагин в аминокислотной последовательности белка. Серин является нейтральной незаряженной аминокислотой, способной образовывать водородные связи, а аспарагин – отрицательно заряженная аминокислота, взаимо-

действующая с другими аминокислотами в полипептидной цепи благодаря образованию ионных связей. Такое изменение взаимодействия внутри полипептида может приводить к нарушению пространственной третичной и четвертичной структур белка, что является критичным для белка-рецептора, в данном случае рецептора фолликулостимулирующего гормона, который взаимодействует с ФСГ по принципу «ключ-замок». Нарушение пространственно-структурного соответствия рецептора и действующего вещества может приводить снижению эффекта работы полового гормона, что в свою очередь значительно повлияет на репродуктивную функцию.

Таблица 1 – Полиморфизмы в пятом экзоне гена *FSHR* у важенок

Генотип	n	Частота генотипов, %		Частота аллелей	P _{HW} *
		наблюдаемая	ожидаемая		
Генотип по полиморфизму A28578G					
GG	39	91	90,9	G – 0,95	0,75
GA	4	9	8,87	A – 0,05	
Генотип по полиморфизму A29110G					
GG	36	84	84,38	G – 0,92	0,56
GA	7	16	14,95	A – 0,08	

Примечания: *P_{HW} – p-value для соответствия наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому согласно равновесию Харди-Вайнберга.

Следует отметить, что нуклеотидная последовательность исследованного участка гена *FSHR* характеризовалась довольно высокой степенью консервативности, что может указывать либо на генетическую однородность исследованной популяции, либо на давление отбора.

Наша гипотеза предполагала, что возможное изменение структуры белка – рецептора фолликулостимулирующего гормона запустит компенсаторные механизмы репродуктивной системы, что приведет к изменению уровня других половых гормонов, в том числе и ФСГ. Однако, не было обнаружено статистически достоверной связи между уровнями половых гормонов (ЛГ, ФСГ, эстрадиол, прогестерон) в крови важенок и присутстви-

ем выявленного в ходе проведенных исследований нуклеотидного полиморфизма. Это указывает на необходимость дальнейшего исследования влияния обнаруженных нуклеотидных замен на репродуктивные показатели важенок, а также иные биохимические и морфологические изменения, связанные с состоянием репродуктивной системы самок северных оленей на разных этапах эстрального цикла.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Нами были описаны новые, не встречавшийся ранее в литературе полиморфизмы в пятом экзоне гена *FSHR*, один из которых менял аминокислотную последовательность белка, приводя к замене S>N, а другой был синонимичным. Замена

аминокислотной последовательности в белке-гормоне не привела к изменению гормонального статуса по таким половым гормонам как ЛГ, ФСГ, эстрадиол, прогестерон у важенок. Необходимо изучение влияния выявленных вариантов генетического полиморфизма, особенно не синонимичного варианта, в рецепторе фолликулостимулирующего гормона непосредственно на уровень репродуктивной функции у важенок, а именно способность вхождения в состояние половой охоты, смещение сроков половой охоты, уровень проявления половой охоты и способность к оплодотворению.

FSHR GENE POLYMORPHISM IN FEMALE REINDEER (RANGIFER TARANDUS)

Krutikova A.A.^{1,2*} – PhD of Biological Sciences, Ass. Prof. of Dep. of Genetic and Reproductive Biotechnology (ORCID 0000-0003-2561-145X); **Belikova A.O.**¹ – PhD-student, teacher of Dep. of Genetic and Reproductive Biotechnology (ORCID 0009-0006-9173-6129); **Peglivanian G.K.**² – Junior Researcher, Laboratory of Molecular Genetics (ORCID 0000-0001-5194-4851); **Nikitkina E.V.**² – PhD of Biological Sciences, Leading Researcher, Laboratory of Developmental Biology (ORCID 0000-0002-8496-5277); **Musidray A.A.**³ – PhD of Biological Sciences, Leading Researcher, Department of Animal Husbandry and Environmental Management of the Arctic (ORCID 0000-0002-0079-9938)

¹St. Petersburg State University of Veterinary Medicine

²Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding — Branch of the L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry;

³ St. Petersburg Federal Research Center Russian Academy of Sciences

* anntim2575@mail.ru

Financing: The study was supported by the grant of the Russian Science Foundation No. 22-16-00085, <https://rscf.ru/project/22-16-00085/>

ABSTRACT

Reindeer herding is an important branch of animal husbandry in Russia, especially in the northern regions of the country. Genomic selection is a method based on the analysis of genetic data on animals in order to select individuals with certain genetic characteristics for breeding. By genetic selecting, it is possible to increase the efficiency of breeding programs, reduce the time to obtain the desired results and improve the quality of the offspring. The *FSHR* (Follicle-Stimulating Hormone Receptor) gene encodes a protein that is a receptor for follicle-stimulating hormone (FSH). Studying the *FSHR* gene is important for understanding the mechanisms of regulation of the reproductive system and searching for new genetic markers associated with reproductive functions in different animal species, including reindeer. The aim of the study was to study the polymorphism of the *FSHR* gene in female reindeer of the Yamalo-Nenets Autonomous Okrug of the Russian Federation. DNA samples from 43 reindeer females (*Rangifer tarandus*) belonging to the same herd were analyzed. We sequenced a 2208 bp *FSHR* region containing the fifth intron of the gene in females from the Yamal Peninsula. During the study of the region, we found two single-nucleotide polymorphisms: G28578A and G29110A. The first polymorphism was located in the second nucleotide of the codon and led to the replacement of serine with asparagine in the amino acid sequence of the protein. The second polymorphism was synonymous and did not lead to a change in the structure of the protein.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Лайшев К.А. Результаты комплексных исследований по созданию племенного оленеводства на полярном урале (итоги работы и перспективы) / К.А. Лайшев, А.А. Южаков, А.А. Юдин, С.В. Коковкина, Т.В. Тарабукина // Научный вестник Ямало-Ненецкого автономного округа. – 2019. – № 1 (102). – С. 21-30. Режим доступа: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=37262479>
2. Лайшев К. А. Проблемы профилактики

бруцеллеза северных оленей и пути их решения / К. А. Лайшев, В. А. Забродин, А. В. Прокудин, Н. В. Винокуров, Е. С. Слепцов // Генетика и разведение животных. – 2018. – № 1. – С. 37-45. doi: 10.31043/2410-2733-2018-1-37-45

3.Брызгалов Г. Я. Биометрические характеристики живой массы в популяциях северных оленей восточной Арктики и Субарктики / Г. Я. Брызгалов, Л. С. Игнатович // Генетика и разведение животных. – 2023. – № 3. – С. 39-46. doi: 10.31043/2410-2733-2023-3-39-46.

4.Bhartiya D., Patel H. An overview of FSH-FSHR biology and explaining the existing conundrums. Journal of ovarian research. 2021; 14(1): 144.

5.Abeygunawardana DI, Ranasinghe RMSBK, De Silva SNT, Deshapriya RMC, Gamika PA, Rajapakse J. Effect of LHCGR and FSHR gene polymorphisms on fertility traits and milk yield of cross-bred dairy cows in Sri Lanka. Anim Biotechnol. 2023 Nov;34(5):1719-1726.

6.Sharifiyazdi H, Mirzaei A, Ghanaatian Z. Characterization of polymorphism in the FSH receptor gene and its impact on some reproductive indices in dairy cows. Anim Reprod Sci. 2018 Jan;188:45-50.

7.Weldenegodguad M., Pokharel K., Ming Y., Honkatukia M., Peippo J., Reilas T, Røed K.H., Kantanen J. Sequencing of reindeer (*Rangifer tarandus*) genomes: Insights into evolution, domestication, and adaptation. 2019. Proc. of the 37th International Conference on Animal Genetics. Spain (Lleida). 42.

REFERENCES

1.Laishev K.A. Results of comprehensive research on the creation of breeding reindeer herding in the Polar Urals (results of work

and prospects) / K.A. Laishev, A.A. Yuzhakov, A.A. Yudin, S.V. Kokovkina, T.V. Tarabukina // Scientific Bulletin of the Yamalo-Nenets Autonomous Okrug. 2019;1 (102): 21-30. URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=37262479> (In Russ.)

2.Laishev K. A. Problems of brucellosis prevention in reindeer and ways to solve them / K. A. Laishev, V. A. Zabrodin, A. V. Prokudin, N. V. Vinokurov, E. S. Sleptsov // Genetics and animal breeding. – 2018. – № 1. – P. 37-45. doi: 10.31043/2410-2733-2018-1-37-45.

3.Bryzgalov G. Ya. Biometric characteristics of live weight in reindeer populations of the eastern Arctic and Subarctic / G. Ya. Bryzgalov, L. S. Ignatovich // Genetics and animal breeding. – 2023. – № 3. – P. 39-46. doi: 10.31043/2410-2733-2023-3-39-46.

4. Bhartiya D., Patel H. An overview of FSH-FSHR biology and explaining the existing conundrums. Journal of ovarian research. 2021; 14(1): 144.

5.Abeygunawardana DI, Ranasinghe RMSBK, De Silva SNT, Deshapriya RMC, Gamika PA, Rajapakse J. Effect of LHCGR and FSHR gene polymorphisms on fertility traits and milk yield of cross-bred dairy cows in Sri Lanka. Anim Biotechnol. 2023 Nov;34(5):1719-1726.

6.Sharifiyazdi H, Mirzaei A, Ghanaatian Z. Characterization of polymorphism in the FSH receptor gene and its impact on some reproductive indices in dairy cows. Anim Reprod Sci. 2018 Jan;188:45-50.

7.Weldenegodguad M., Pokharel K., Ming Y., Honkatukia M., Peippo J., Reilas T, Røed K.H., Kantanen J. Sequencing of reindeer (*Rangifer tarandus*) genomes: Insights into evolution, domestication, and adaptation. 2019. Proc. of the 37th International Conference on Animal Genetics. Spain (Lleida). 42.