

УДК 575.116.4:575.2

DOI: 10.17238/issn2072-2419.2020.4.111

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ЛИГАНД-ЗАВИСИМОГО ЯДЕРОВОГО РЕЦЕПТОРА ТИПА КОРЕПРЕССОРА СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ

А.А. Крутикова—к.б.н., старший научный сотрудник, О.Ю. Баркова - к.б.н., старший научный сотрудник; ВНИИГРЖ

Ключевые слова: северный олень, однонуклеотидный полиморфизм, живая масса, LCORL, генотип, аллели. **Keywords:** reindeer, SNP, body weight, LCORL, genotype, alleles.



РЕФЕРАТ

В России северный олень является сельскохозяйственным животным. Были выведены и активно используются в арктической зоне России четыре породы северного оленя (эвенская, эвенкийская, ненецкая, чукотская). Наиболее распространенными и многочисленными породами оленей, разводимых в Арктической зоне России, являются ненецкая и эвенкийская. Они существенно отличаются размерами и массой тела, а также зоной обитания, так ненецкая порода обитает в тундровой зоне, эвенкийская – в таежной. Кроме того, в Арктической зоне имеются большие популяции дикого северного оленя. Исследования в области генетики мясной продуктивности сельскохозяйственных животных выявили несколько генов, определяющих формирование и развитие мышечной массы. Полиморфизм в гене LCORL ассоциирован с показателями размера тела у различных видов млекопитающих. Целью данного исследования было обнаружение вариантов генетического полиморфизма кодирующего участка гена LCORL у домашних северных оленей. LCORL (мРНК-лиганд-зависимый ядерный рецептор типа корепрессора) представляет собой фактор транскрипции, расположенный в ядре и использует консервативный мотив спираль-поворот-спираль для связывания ДНК. Проведенные исследования двух участков экзона 7 гена LCORL у особей диких и домашних северных оленей выявили наличие семи однонуклеотидных полиморфизмов, шесть из которых являются несинонимичными, т.е. приводящими к замене аминокислот в белковой последовательности. Различия частот встречаемости аллелей дикого типа и мутантных аллелей между особями диких и двух пород домашних северных оленей свидетельствует о наличии селекционного давления на регион гена LCORL и косвенно подтверждает влияние генетической изменчивости данного локуса на фенотипическую изменчивость показателей роста и размера тела у северных оленей. Учитывая аналогии с исследованиями влияния гена LCORL на признаки размера у других видов животных можно предположить, что некоторые полиморфизмы в исследованном участке могут быть истинными причинными локусами количественных признаков у домашних северных оленей.

ВВЕДЕНИЕ

Совершенствование пород домашнего северного оленя с целью увеличения мясной продуктивности обуславливает внедрение современных методов молекуляр-

ной генетики в практику оленеводства. Основными породами северного оленя, разводимого в арктической зоне России, являются ненецкая и эвенкийская. Кроме того, существуют обширные популяции

дикого северного оленя. Исследования в области генетики мясной продуктивности сельскохозяйственных животных выявили несколько генов, определяющих формирование и развитие мышечной массы. Варианты генетического полиморфизма (SNP, инсерции, делеции) в генах мясной продуктивности оказывают значимое влияние на усиленный рост живой массы. К таким генам относят миостатин, гормон роста, кальпаSTATин, рецептор гормона роста и другие, а также ген LCORL. Предыдущие исследования показали, что полиморфизмы внутри LCORL коррелировали с размером и высотой скелета человека [1], размером тела лошади [2], ростом и размером туши крупного рогатого скота [1,3], характеристиками живой массы курицы [4], размером тела овец [5], размером тела собаки и свиньи [6,7].

Целью данного исследования было обнаружение вариантов генетического полиморфизма кодирующего участка гена LCORL у домашних северных оленей.

LCORL (мРНК-лиганд-зависимый ядерный рецептор типа корепрессора) представляет собой фактор транскрипции, расположенный в ядре, использует консервативный мотив спираль-поворот-спираль для связывания ДНК. Интересно, что локус NCAPG-LCORL оказывает плейотропное влияние на признаки организма. Ассоциация аллеля увеличения роста/веса с уменьшением толщины подкожно-жировой клетчатки постоянно обнаруживалась в исследованиях [8,9].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований послужила ДНК, выделенная классическим фенольным методом из крови домашнего северного оленя двух пород - ненецкой и эвенкийской, а также из образцов тканей дикого северного оленя. Праймеры для проведения ПЦР и последующего секвенирования подбирали с помощью BLAST международной базы генетических данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) с использованием референсного генома белохвостого оле-

ня (*Odocoileus virginianus texanus*), поскольку после нескольких попыток китайских ученых [10] отсекавировать и собрать полный геном северного оленя (*rangifer tarandus*) оказалось, что сборка не полная и имеет большое количество ошибок. Сборка, выполненная европейскими учеными [11], отсутствует в свободном доступе. Две пары праймеров для локусов LCORL-9 и LCORL-10 (синтезированы ООО «Синтол»): L-9-F: TTT-TGA-GTA-AGA-CTG-AGG-GA и L-9-R: GTG-GTC-TTC-CAT-GGT-GGT-CT, L-10-F: TCT-TAG-CAA-ACT-GAA-CAA-AA и L-10-R: GCC-AAG-AAA-TTA-GAT-TGT-CCA.

Праймеры охватывают два смежных участка экзона 7 гена LCORL в 438 и 212 п.н. соответственно. ПЦР на амплификаторе Thermal Cycler T100 (Bio-Rad, США) проводили в следующем режиме: – 95°C, 40 циклов 95°C – 20 сек., 61°C – 20 сек., 72°C – 20 сек. и финальная элонгация 72°C – 4 минуты. Полученный ПЦР-продукт проверяли на электрофорезе в 2,0% агарозном геле. Секвенирование по Сенгеру полученного ампликона осуществляли с помощью генетического анализатора Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer с использованием коммерческих наборов BigDye® Terminator v3.1 Sequencing Standard Kit (Applied Biosystems) согласно протоколу производителя. Полученные сиквенсы выравнивали и анализировали с помощью программного обеспечения Mega-6 (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MAGEA6>).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При сравнении последовательностей локусов LCORL-9 и LCORL-10 с аналогичными локусами гена LCORL домашней овцы была обнаружена гомология 97%. Идентификацию SNPs проводили в международной базе генетических данных Ensembl (<https://www.ensembl.org/>) по референсному геному домашней овцы (*Ovis aries*), как наиболее гомологичному и имеющемуся в свободном доступе геному. В результате были идентифицированы семь однонуклеотидных замен, шесть

Таблица 1

Однонуклеотидные замены в локусах LCORL-9 и LCORL-10

Локус	Замена	Позиция*	Изменение аминокислоты
LCORL-9	A/G	2225917	Lys (K) – Glu (E)
LCORL-9	A/G	2225918	Lys (K) – Arg (R)
LCORL-9	G/A	2225922	Glu (E) synonymous
LCORL-9	A/G	2225938	Ser (S) – Gly (G)
LCORL-9	A/G	2225939	Ser (S) – Asn (N)
LCORL-9	T/C	2225950	Phe (F) – Leu (L)
LCORL-10	T/A	2226355	Trp (W) – Arg (R)

* - идентификация позиции SNPs проводилась по геному овцы домашней (*Ovis aries*)

из которых находились в локусе LCORL-9, а одна в локусе LCORL-10 экзона 7 (табл. 1).

Из семи замен, только одна оказалась синонимичной (G 2225922 A в локусе LCORL-9), поскольку замена третьего нуклеотида в кодоне не приводит к изменению аминокислоты. Все другие одиночные нуклеотидные полиморфизмы характеризуются как несинонимичные, то есть влекут за собой замену аминокислот в составе белка, что может существенно влиять на его структурные и функциональные особенности.

Анализ полученных данных позволяет отметить высокий уровень полиморфизма у исследованных представителей трех различных популяций северного оленя (дикий северный олень, ненецкая и эвенкийская породы оленей), что подтверждается наличием семи выявленных SNP (табл. 2) в двух локусах экзона 7 гена LCORL общим размером около 600 пар нуклеотидов. Такой уровень полиморфизма свидетельствует о нестабильности изученного региона гена LCORL у популяций северного оленя.

Это соответствует данным других исследователей, изучавших гена LCORL на других видах животных. Ген LCORL был идентифицирован как высоко полиморфный и сильно дифференцированный у

различных спортивных и охотничьих пород собак [6], а также у выборки домашних свиней европейских пород [7]. Такая дестабилизация определенных участков генома может быть следствием направленных селекционных процессов, проводимых целью увеличения скелетной мускулатуры животных и косвенно свидетельствовать о возможной ассоциации полиморфизма в изучаемом регионе с увеличением мышечной массы у животных. На основании анализа научных публикаций, полиморфизм в гене LCORL ассоциирован с показателями размера тела у различных, как минимум шести, видов млекопитающих [1-6] и, соответственно, находится под селекционным давлением. Таким образом можно считать ген LCORL наиболее вероятным функциональным геном-кандидатом определяющим показатели размера тела и у северных оленей. Фенотипическую изменчивость по размерам и массе тела животных обуславливают как одиночные нуклеотидные полиморфизмы в кодирующих последовательностях гена LCORL, так и инсерции, приводящие к сдвигу рамки считывания [12]. При этом благоприятный аллель, несущий инсерцию в один нуклеотид имел частоту встречаемости 0,95 у пород коз, селекционируемых по размеру тела и 0,35 у мелких пород. Ана-

Таблица 2

Распределение частот встречаемости генотипов и аллелей по семи SNP в трех анализируемых популяциях северного оленя

SNP	ПОПУЛЯЦИЯ					
	Дикий северный олень		Ненецкая порода		Эвенкийская порода	
A 2225917 G	AA – 1,00 AG – 0,00 GG – 0,00	A – 1,00 G – 0,00	AA – 0,29 AG – 0,29 GG – 0,42	A – 0,43 G – 0,57	AA – 0,00 AG – 0,22 GG – 0,78	A – 0,11 G – 0,89
A 2225918 G	AA – 0,83 AG – 0,00 GG – 0,17	A – 0,83 G – 0,17	AA – 0,71 AG – 0,00 GG – 0,29	A – 0,71 G – 0,29	AA – 0,45 AG – 0,22 GG – 0,33	A – 0,56 G – 0,44
G 2225922 A	GG – 0,67 GA – 0,33 AA – 0,00	G – 0,83 A – 0,17	GG – 0,43 GA – 0,14 AA – 0,43	G – 0,50 A – 0,50	GG – 0,00 GA – 0,22 AA – 0,78	G – 0,11 A – 0,89
A 2225938 G	AA – 0,83 AG – 0,17 GG – 0,00	A – 0,92 G – 0,08	AA – 0,86 AG – 0,00 GG – 0,14	A – 0,86 G – 0,14	AA – 0,67 AG – 0,00 GG – 0,33	A – 0,67 G – 0,33
A 2225939 G	AA – 0,50 AG – 0,50 GG – 0,00	A – 0,75 G – 0,25	AA – 0,57 AG – 0,43 GG – 0,00	A – 0,79 G – 0,21	AA – 0,67 AG – 0,22 GG – 0,11	A – 0,78 G – 0,22
T 2225917 C	TT – 0,83 TC – 0,17 CC – 0,00	T – 0,92 C – 0,08	TT – 0,72 TC – 0,14 CC – 0,14	T – 0,79 C – 0,21	TT – 0,67 TC – 0,22 CC – 0,11	T – 0,78 C – 0,22
T 2226355 A	TT – 0,78 TA – 0,22 AA – 0,00	T – 0,89 A – 0,11	TT – 0,82 TA – 0,18 AA – 0,00	T – 0,91 A – 0,09	TT – 0,44 TA – 0,56 AA – 0,00	T – 0,72 A – 0,28

логично, в наших исследованиях особи из анализируемой популяции диких северных оленей практически не имели гомозиготных генотипов по мутантному аллелю по шести из семи выявленных SNP, и, напротив, у исследованных особей двух пород домашнего северного оленя частота встречаемости гомозигот по мутантному аллелю достигала 0,78 по однонуклеотидным полиморфизмам A2225917G и G2225922A, что свидетельствует о селекционном процессе, оказывающем давление на регион гена LCORL у домашнего северного оленя.

ВЫВОДЫ

Шесть однонуклеотидных полиморфизмов из семи выявленных являются несинонимичными. Различия частот встречаемости аллелей дикого типа и мутантных аллелей между особями диких и двух пород домашних северных оленей свидетельствует о наличии селекционного давления на регион гена LCORL и кос-

венно подтверждает влияние генетической изменчивости данного локуса на фенотипическую изменчивость показателей роста и размера тела у северных оленей. Учитывая аналогии с исследованиями влияния региона гена LCORL на признаки размера у других видов животных можно предположить, что некоторые полиморфизмы в исследованном участке могут быть истинными причинными локусами количественных признаков (QTL) у домашних северных оленей.

НИР выполнена в рамках Госзадания (№ АААА-А18-118021590138-1).

Analysis of the ligand-dependent nuclear receptor gene of corepressor type polymorphism in reindeer. Krutikova A. PhD of Biol. Scie, senior researcher; Barkova O. PhD Biol. Sci, Senior Researcher (All-Russian Research Institute Of Genetics And Culture Of Agricultural Animals)

ABSTRACT

In Russia, the reindeer is a farm animal. Four breeds of reindeer (Even, Evenk, Nenets, Chukchi) were developed and are actively used in the Arctic zone of Russia. The most widespread and numerous breeds of deer bred in the Arctic zone of Russia are the Nenets and Evenk. They differ significantly in size and body weight, as well as in the habitat zone, as the Nenets breed lives in the tundra zone, the Evenk breed in the taiga. In addition, there are large populations of wild reindeer in the Arctic zone. Studies in the field of genetics of meat productivity of farm animals have identified several genes that determine the formation and development of muscle mass. Polymorphism in the LCORL gene is associated with indicators of body size in various mammalian species. The aim of this study was to detect variants of the genetic polymorphism of the coding region of the LCORL gene in domesticated reindeer. LCORL (mRNA ligand-dependent nuclear receptor type co-repressor) is a transcription factor located in the nucleus and uses a conserved helix-turn-helix motif for DNA binding. Studies of two regions of exon 7 of the LCORL gene in individuals of wild and domestic reindeer revealed the presence of seven single nucleotide polymorphisms, six of which are not synonymous, that is, leading to amino acid substitution in the protein sequence. The difference in the frequencies of wild-type and mutant alleles between individuals of wild and two breeds of domesticated reindeer indicates the presence of selection pressure on the region of the LCORL gene and indirectly confirms the influence of genetic variability of this locus on the phenotypic variability of growth and body size in reindeer. Given the analogies with studies of the influence of the LCORL gene on size traits in other animal species, it can be assumed that some polymorphisms in the studied area may be true causal quantitative trait loci (QTL) in domestic reindeer.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pryce J.E., Hayes B.J., Bolormaa S., Goddard M.E. Polymorphic regions affecting human height also control stature incattle. 2011. *Genetics*. 187. 981–984.
2. Boyko A.R., Brooks S.A., Behan-Braman A., Castelhana M., Corey E., Oliveira K.C. Genomic analysis establishes correlation between growth and laryngeal neuropathy in thoroughbreds. 2014. *BMC Genomics*. 15, 259.

3. Randhawa I.A., Khatkar M.S., Thomson P.C., Raadsma H.W. Composite selection signals for complex traits exemplified through bovine stature using multi-breed cohorts of European and African *Bos taurus*. 2015. *G3 (Bethesda)*. 5. 1391–1401.
4. Liu R.R., Sun Y.F., Zhao G.P., Wang H.Y., Zheng M.Q., Liu L. Identification of loci and genes for growth related traits from a genome-wide association study in a slow- \times fast-growing broiler chicken cross. 2015. *Genes & Genomics*. V.37. 829–836.
5. Kijas J. W. Haplotype-based analysis of selective sweeps in sheep. 2014. *Genome*. 57. 433–437.
6. Vaysse A., Ratnakumar A., Derrien T., Axelsson E., Rosengren Pielberg G., Sigurdsson S. Identification of genomic regions associated with phenotypic variation between dog breeds using selection mapping. 2011. *PLoS Genetics*. 7. e1002316
7. Rubin C.J., Megens H.J., Martinez Barrio A., Maqbool K., Sayyab S., Schwochow D. Strong signatures of selection in the domestic pig genome. 2012. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 109. 19529–19536.
8. Weikard R., Altmair E., Suhre K., Weinberger K.M., Hammon H. M., Albrecht E. Metabolomic profiles indicated distinct physiological pathways affected by two loci with major divergent effect on *Bos Taurus* growth and lipid deposition. 2010. *Physiol. Genomics*. 42A. 79–88.
9. Lindholm-Perry A.K., Sexten A.K., Kuehn L.A., Smith T.P., King D.A., Shackelford S.D. Association, effects and validation of polymorphisms within the NCAPG-LCORL locus located on BTA6 with feed intake, gain, meat and carcass traits in beef cattle. 2011. *BMC Genet*. 12. 103.
10. Taylor R.S., Horn R.L., Zhang X., Golding G.B., Manseau M., Wilson P.J. The Caribou (*Rangifer tarandus*) Genome. 2019. *Genes*. 10(7). 540.
11. 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.
12. Saif R., Henkel J., Jagannathan V., Drögemüller C., Flury C., Leeb T. The LCORL Locus Is under Selection in Large-Sized Pakistani Goat Breeds. 2020. *Genes*. 11. 168.