



УДК 575.162

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2022.3.200

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА GRM8 и КАЧЕСТВО СПЕРМЫ ЖЕРЕБЦОВ

Никиткина Е.В.-к.биол.н., Крутикова А.А.- к.биол.н., Мусидрай А.А.-асп.
ВНИИГРЖ– филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К.
Эрнста»

Ключевые слова: SNP, сперма, жеребцы, полиморфизм гена **Keywords:** SNP, semen, stallions, gene polymorphism



РЕФЕРАТ

Поиск геномных ассоциаций GWAS (Genome-Wide Association Studies) с признаками фертильности позволит в дальнейшем вести отбор животных на геномном уровне, а геномная селекция позволит отбирать животных с хорошим сперматогенезом в раннем возрасте. После проведения нами GWAS было выявлено несколько генов кандидатов, ассоциированных с качеством спермы жеребцов. Одним из таких генов стал ген GRM8. В ходе исследований методом секвенирования по Сэнгеру выявлены четыре SNP в экзоне гена GRM8 и проведена их ассоциация с качеством спермы жеребцов. Для генотипа rs1138419111 достоверных различий по изучаемым параметрам не обнаружено. По выявленной одиночной нуклеотидной замене rs1147388106 наибольший объем эякулята был у жеребцов с генотипом GG. По SNP rs395286150 лучшее качество спермы имели жеребцы с гетерозиготным генотипом CT. Анализ данных по SNP rs394524550 выявил значительное влияние генотипа на прогрессивную подвижность. Три из четырех SNP идентифицированных в экзоне гена GRM8 достоверно связаны с такими показателями качества спермы жеребцов, как объем эякулята, концентрация и прогрессивная подвижность. Проект Минобрнауки № 121052600354-7.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из основных факторов, влияющих на воспроизводительную функцию, является генотип животного. Интенсификация геномной технологии животных успешно применяется в селекционных программах большинства стран и основывается на использовании полиморфных однонуклеотидных замен (SNP) как маркеров для определения ценности генотипа животного. Геномная селекция направлена в основном на признаки про-

дуктивности. Считается, что репродуктивное здоровье и признаки репродукции плохо наследуются и вести селекцию по этим признакам малоэффективно. Однако, формирование и функционирование репродуктивной системы животных происходит в результате согласованного взаимодействия широкого спектра генов. Поиск геномных ассоциаций GWAS (Genome-Wide Association Studies) с признаками фертильности позволит в дальнейшем вести отбор животных на геном-

ном уровне, а геномная селекция позволит отбирать животных с хорошим сперматогенезом и качеством спермы в раннем возрасте, до начала использования для получения спермы.

После проведения нами GWAS было выявлено несколько генов кандидатов, ассоциированных с качеством спермы жеребцов. Одним из таких генов стал ген GRM8, который кодирует белок метаболитный глутаматный рецептор 8.

Целью работы был поиск ассоциаций SNP в экзоне гена GRM8 с качеством спермы жеребцов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для поиска причинных мутаций была проведена работа по поиску полиморфных вариантов в маркерных регионах, выявляемых с помощью GWAS. Полногеномный анализ позволил идентифицировать ген GRM8 как достоверно ассоциированный с качеством спермы. В ходе исследований методом секвенирования по Сэнгеру выявлены четыре SNP в экзоне гена GRM8 и проведена их ассоциация с качеством спермы жеребцов.

Сперма от 22 жеребцов была получена на искусственную вагину. Оценка объема, концентрации и подвижности сперматозоидов проведена общепринятыми мето-

дами, а также с использованием компьютерной программы (CASA) – «Аргус Софт».

ДНК для проведения генетического анализа выделена из спермы фенольно-хлороформным методом. При выделении использовался меркаптоэтанол.

Дизайн праймеров для амплификации анализируемого фрагмента и последующего секвенирования проводился с помощью онлайн-инструмента BLAST NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Для анализа участка гена GRM8 использовали праймеры:

F:GGTCGATCGCATAAAGCATGG и R:TTCTGCTACAGGGCTGACTTC. Секвенирование по Сэнгеру проводили на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer с помощью коммерческих наборов Kit BigDye® Terminator v3.1 Sequencing Standard Kit (Applied Biosystems) согласно протоколу производителя. Выравнивание и обработка сиквенсов проводилось с помощью программного обеспечения Mega-6 (https://www.megasoftware.net/web_help_10/index.htm#Citing_MEGA_In_Publications.htm).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для генотипа rs1138419111 достоверных различий по изучаемым параметрам

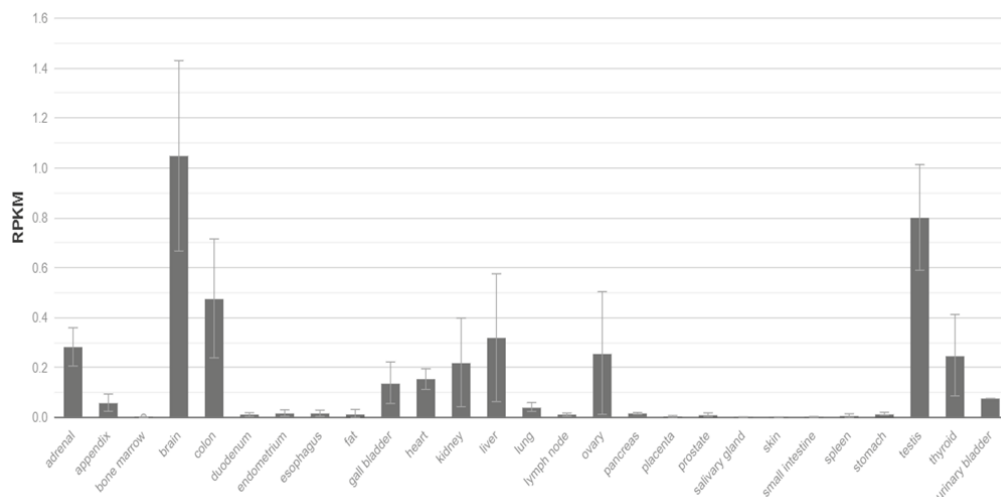


Рис.1. Уровень экспрессии гена GRM8 в тканях человека– (NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2918>)

не обнаружено. По выявленной одиночной нуклеотидной замене rs1147388106 наибольший объем эякулята был у жеребцов с генотипом GG ($55,9 \pm 26,5$ мл) по сравнению с жеребцами с генотипами GA ($32,5 \pm 13,9$ мл) и AA ($18,0 \pm 33,6$) ($P < 0,05$). При анализе данных по SNP rs395286150 лучшее качество спермы имели жеребцы с гетерозиготным генотипом СТ. Так, у жеребцов с генотипом СТ концентрация клеток составила $317,0 \pm 66,5$ млн/мл, с генотипами CC - $209,6 \pm 58,2$ и $189,5 \pm 74,9$ % соответственно ($P < 0,05$). Прогрессирующая подвижность сперматозоидов у жеребцов с генотипом СТ составила $65,5 \pm 20,5$ % против $48,7 \pm 22,0$ % у жеребцов с генотипом ТТ и $48,4 \pm 18,6$ % с генотипом СС. Анализ данных по SNP rs394524550 выявил значительное влияние генотипа на прогрессивную подвижность. У жеребцов с генотипом АГ прогрессивная подвижность составила $64,6 \pm 16,3$ %, а у жеребцов с GG и AA — $32,7 \pm 15,7$ и $49,6 \pm 18,1$ % соответственно ($P < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Метаботропные рецепторы глутамата представляют собой семейство рецепторов, связанных с G-белком, которые были разделены на 3 группы на основе гомологии последовательностей, предполагаемых механизмов передачи сигнала и фармакологических свойств. Группа III включает GRM4, GRM6, GRM7 и GRM8. Рецепторы группы II и III, в том числе и рецептор GRM8, связаны с ингибированием каскада циклического АМФ. Активация этих рецепторов приводит к ингибированию высвобождения глутамата по принципу обратной связи за счет ингибирования входа кальция в клетку [1].

Наивысший уровень экспрессии гена глутаматного метаботропного рецептора 8 (GRM8) зафиксирован в головном мозге и семенниках.

У лошадей ген GRM8 расположен на 4 хромосоме, протяженность его составляет 716132 п.н., состоит из 11 экзонов.

До недавнего времени сообщалось об экспрессии только гена рецептора GRM6 в семенниках мышей [2]. Позднее была

исследована экспрессия рецепторов GRM4, GRM6, GRM7 и GRM8 в репродуктивной системе самцов мышей. В результате транскрипты каждого из рецепторов GRM группы III были обнаружены в семенниках человека, причем самые высокие уровни мРНК были обнаружены для GRM8 [3].

Анализ методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией позволил выявить экспрессию рецепторных транскриптов GRM6, GRM7 и GRM8 за исключением GRM4, в семенниках и эпидидимисах взрослых мышей, а также в эпидидимисах 21-дневных мышей с геноспецифической интенсивностью. Более того, мРНК GRM6 и GRM8 была обнаружена в сперматозоидах, выделенных из семявыносящего протока. [4].

В течение многих лет функция рецепторов GRM была связана с ЦНС и синаптической передачей. Однако недавние данные показывают, что эти рецепторы также экспрессируются в ненейронных тканях, многие из которых даже не происходят из нервного гребня. Пополняющиеся данные о переносчиках глутамата и рецепторах глутамата в семенниках [5,6] подтверждает гипотезу о том, что этот орган может иметь собственную глутаматэргическую систему.

Неравномерность уровней мРНК GRM6 и GRM8 в сперматозоидах была признана маркером мужского бесплодия у человека. [7].

Таким образом, полученные нами результаты подтверждают выводы других исследователей [4], что эндогенно экспрессируемые члены рецепторов GRM группы III, в частности GRM8, играют функциональную роль в формировании мужской репродуктивной функции и влияют на качество спермы.

Три из четырех SNP идентифицированных в экзоне гена GRM8 достоверно связаны с такими показателями качества спермы жеребцов, как объем эякулята, концентрация и прогрессивная подвижность.

Проект Минобрнауки № 121052600354-7.

GRM8 GENE POLYMORPHISM AND STALLION SPERM QUALITY

Nikitkina E.V., Krutikova A.A., Musidray A.A.

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

ABSTRACT

Genome-Wide Association Studies fertility will allow further selection of animals at the genomic level, and genomic selection will allow the selection of animals with good spermatogenesis at an early age. After our GWAS, several candidate genes associated with stallion sperm quality were identified. One of these genes was the GRM8 gene. In the course of Sanger sequencing studies, four SNPs were identified in the exon of the GRM8 gene and their association with the quality of stallion sperm was carried out. For the rs1138419111 genotype, no significant differences were found in the studied parameters. According to the identified single nucleotide substitution rs1147388106, the largest volume of ejaculate was in stallions with the GG genotype. According to SNP rs395286150, stallions with the heterozygous CT genotype had the best sperm quality. Analysis of data on the SNP rs394524550 revealed a significant effect of the genotype on progressive motility. Three of the four SNPs identified in the exon of the GRM8 gene are significantly associated with such indicators of stallion sperm quality as ejaculate volume, concentration, and progressive motility. Project of the Ministry of Education and Science No. 121052600354-7.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- 1.Ferraguti F. Metabotropic glutamate receptors /F. Ferraguti, R. Shigemoto// Cell Tissue Res.-2006. - № 326. – С. 483–504. doi:10.1007/S00441-006-0266-5.
- 2.Vardi T. mGluR6 transcripts in non-neuronal tissues /T.Vardi, M. Fina, L. Zhang, A. Dhingra, N. Vardi// Histochem. Cytochem.-2011.-№59.-С. 1076–1086. doi:10.1369/0022155411425386.
- 3.Julio-Pieper M. Regulation of the brain–gut axis by Group III metabotropic glutamate receptors / M. Julio-Pieper, R. O'Connor, T. Dinan, J Cryan //Eur. J. Pharmacol.-2013.-№ 698.-С. 19–30. doi:10.1016/J.EJPBAR.2012.10.027.
- 4.Marciniak M. Expression of group III metabotropic glutamate receptors in the reproductive system of male mice/ M. Marciniak, B. Chrus'cicka, T. Lech, G. Burnat, A. Pilc // Reproduction, Fertility and Development. -2016. -№ 28(3). – С.369-374 <http://dx.doi.org/10.1071/RD14132> .
- 5.Hu J. Identification of glutamate transporters and receptors in mouse testis/ J. Hu, N. Yang, Y. Ma, J. Jiang, J. Zhang, J. Fei, L. Guo //Acta Pharmacol. Sin. – 2004. - №25. – С.366–371.
- 6.Takarada T. Possible expression of functional glutamate transporters in the rat testis. / T. Takarada, E. Hinoi, V. Balcar, H. Taniura, Y. Yoneda //J. Endocrinol. – 2004. - №181.- С. 233–244. doi:10.1677/JOE.0.1810233.
- 7.Sendler E. Stability, delivery and functions of human sperm RNAs at fertilization. /E. Sendler, G. Johnson, S. Mao, R. Goodrich, M. Diamond, R.Hauser, S. Krawetz // Nucleic Acids Res. – 2013.- № 41.-С. 4104–4117. doi:10.1093/NAR/GKT132.