

Изучение альтернативного сплайсинга в генах LEPR, PRLR, GHR крупного рогатого скота в аспекте молочной продуктивности

Ольга Александровна Скачкова¹, Алексей Алексеевич Васильев², Артем Владимирович Бригида¹

¹Институт инновационных биотехнологий в животноводстве – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», г. Москва, Россия, oaskachkova@mail.ru.

²ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», г. Москва, Россия, alekseyvasiliev@yandex.ru

Аннотация. Специфические гены LEPR, PRLR, GHR крупного рогатого скота являются частью комплекса молочной продуктивности, показателям которой при оценке животных придается большое значение (удой, содержание массовой доли белка и жира в молоке). Рассмотрены актуальные вопросы функциональной активности генов, опосредованной альтернативным сплайсингом, в процессе которого возможны функциональные мутации, непосредственно ответственные за различия в фенотипах. Имеющиеся данные об альтернативно сплайсированных вариантах транскриптов мРНК генов PRLR, GHR и LEPR свидетельствуют о выявленных двух изоформах у гена PRLR (l-PRLR и s-PRLR), изменения соотношения которых в том числе влияют на экспрессию β -казеина, являющегося одним из белков молока. GHR существует в виде двух изоформ (fl-GHR и d3-GHR), распространенных в большинстве популяций, а у LEPR было идентифицировано шесть изоформ LEPR (LEPRa – LEPRf). При этом в длинной изоформе LEPRb мутации связаны с ожирением и дисфункцией гипофиза, а роли остальных изоформ остаются неопределенными. Раскрытие в дальнейших исследованиях мутаций и показателей изменений пропорций в изоформах, специфичных в отношении молочной продуктивности, можно рассматривать как новые и наиболее эффективные молекулярно-генетические маркеры.

Ключевые слова: молочный скот; альтернативный сплайсинг; ген рецептора пролактина; ген рецептора гормона роста; ген рецептора лептина; изоформы.

Для цитирования: Скачкова О. А., Васильев А. А., Бригида А. В. Изучение альтернативного сплайсинга в генах LEPR, PRLR, GHR крупного рогатого скота в аспекте молочной продуктивности // Аграрный научный журнал. 2022. № 2. С. 61–64. <http://dx.doi.org/10.28983/asj.y2022i2pp61-64>.

VETERINARY MEDICINE AND ZOOTECHNICS

Original article

Study of alternative splicing in LEPR, PRLR, GHR genes of cattle in terms of milk productivity

Olga A. Skachkova¹, Alexey A. Vasiliev², Artem V. Brigida¹

¹Institution of Innovative Biotechnology in Animal Husbandry - a branch of the Federal State Budgetary Scientific Institution “Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst”, oaskachkova@mail.ru.

²Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MBA named after K.I. Scriabin”, Moscow, Russia, alekseyvasiliev@yandex.ru

Abstract. Specific genes LEPR, PRLR, GHR of cattle are part of the complex of milk productivity, the indicators of which, when evaluating animals, are given great importance (milk yield, content of mass fraction of protein and fat in milk). The review considers topical issues of the functional activity of genes mediated by alternative splicing, during which some functional mutations are possible that are directly responsible for differences in phenotypes. The available data about alternatively spliced variants of mRNA transcripts of the PRLR, GHR and LEPR genes indicate that two isoforms of the PRLR gene have been identified (l-PRLR and s-PRLR), changes in the ratio of which, inter alia, affect the expression of β -casein, which is one of the milk proteins. GHR exists as two isoforms (fl-GHR and d3-GHR), which are widespread in most populations, and six LEPR isoforms (LEPRa - LEPRf) have been identified in LEPR, while in the long isoform LEPRb mutations are associated with obesity and pituitary dysfunction and the roles of the rest isoforms remain undefined. Disclosure in further studies of mutations and indicators of changes in proportions in isoforms specific for milk productivity can be considered as new and most effective molecular genetic markers.

Keywords: dairy cattle; alternative splicing; prolactin receptor gene; growth hormone receptor gene; leptin receptor gene; isoforms.

For citation: Skachkova O. A., Vasiliev A. A., Brigida A. V. Study of alternative splicing in LEPR, PRLR, GHR genes of cattle in terms of milk productivity. Agrarnyy nauchnyy zhurnal = Agrarian Scientific Journal. 2022;(2):61–64. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.28983/asj.y2022i2pp61-64>.

За последние десятилетия (с 1987 по 2018 г.) мировое производство молока, в том числе коровьего, увеличилось с 522 до 843 млн т (более чем на 61 %) [12]. В экономических характеристиках, определяющих производство молока, значимая роль отводится геномной селекции, позволяющей прогнозировать желаемую продуктивность сразу после рождения животного, а в случаях пересадки эмбрионов коровам-реципиентам – на стадии бластоцисты.





Наиболее известными маркерами, применяемыми в геномной селекции, являются однонуклеотидные полиморфизмы (single nucleotide polymorphisms, SNP) из-за их высокой частоты и дисперсии в геноме. Эти полиморфизмы представляют собой изменения в последовательности ДНК и могут быть связаны с любым конкретным признаком, что позволяет выявлять надежные SNP в отношении интересующих фенотипов. В ряде исследований сообщалось о SNP, ассоциируемых со значительным влиянием на признаки молочной продуктивности в гене рецептора пролактина PRLR [1], в гене рецептора роста GHR [3], в гене рецептора лептина LEPR [13]. Следовательно, PRLR, GHR, LEPR являются маркерными генами-кандидатами по определению признаков, связанных с молочной продуктивностью у дойных коров.

С накоплением экспериментальных данных становится все более очевидным, что геном млекопитающих представляет собой динамично функционирующую структуру, содержащую множественные регуляторные элементы, которые контролируют не только работу генов, но и уровень их активности. Одним из важных механизмов регуляции генной активности является альтернативный сплайсинг [10], в процессе которого возможны функциональные мутации, непосредственно ответственные за различия в фенотипах, что может быть использовано в качестве эффективных маркеров, ассоциированных с продуктивностью молочного скота, его устойчивостью к болезням, адаптивностью к ландшафтно-климатическим условиям среды. Однако исследования по функциональному анализу с вовлечением генов PRLR, GHR, LEPR в настоящий период времени являются новыми и отражены в немногих научных работах.

Цель данной работы направлена на выявление источников коррелированной информации, связанной с альтернативным сплайсингом в генах PRLR, GHR и LEPR для расширения знаний о функциональной активности этих генов и значимости функциональных мутаций в спектре признаков молочной продуктивности крупного рогатого скота.

Функциональная активность генов млекопитающих, опосредованная альтернативным сплайсингом. Известно, что первая копия мРНК, полученная с ДНК, содержит в себе весь набор экзонов и интронов (прематричные РНК), а процесс созревания мРНК включает в себя стадию сплайсинга (splice, сращивание), в ходе которого интроны вырезаются, а экзоны сшиваются между собой в различных комбинациях (в ряде случаев с сохранением интронов), что называется альтернативным сплайсингом [7]. Это приводит к изменению структуры первичного транскрипта мРНК и продуцированию одним геном множества вариантов изоформ мРНК, имеющих различную физиологическую активность и функции [10]. Альтернативный сплайсинг является специфичным для различных тканей и типов клеток, имеет множество регуляторных механизмов, действующих согласованно, и играет ключевую роль в поддержании функции клеток и тканевого гомеостаза, в развитии и функционировании нервной, мышечной, иммунной и других систем [7]. На сегодняшний день известно, что альтернативному сплайсингу подвергаются более чем 90 % генов млекопитающих [10], биологические функции многих из которых до сих пор остаются невыясненными, что может быть объяснено сложностью организации генных сетей и значительной плейотропностью генов, контролирующих большинство фенотипических признаков.

Изменение структуры транскрипта мРНК в процессе альтернативного сплайсинга может повлиять на кодируемый белок и тем самым нарушить его структуру и функцию, а также повлечь за собой мутации в генах, влияющие позитивно или негативно на фенотипы, в том числе на показатели экономических характеристик, таких как молочная продуктивность крупного рогатого скота [6].

Ген рецептора PRLR. Ген рецептора пролактина PRLR (GeneID: 5618), согласно данным NCBI (The National Center for Biotechnology Information, USA, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5618>, дата обращения 14.10.2021), так же известный как HPRL, MFAB, hPRLrI, RI-PRLR, относится к семейству цитокиновых рецепторов типа I и в качестве трансмембранного рецептора связывает нейроэндокринный гормон пролактин (PRL). PRL участвует в реализации более 300 функций в процессах водно-электролитного обмена, роста и развития, эндокринной системы, метаболизма, воспроизводства, иммунорегуляции [9], в иницировании и поддержании лактации у молочного скота.

Плейотропные функции PRL опосредованы различными изоформами его рецептора PRLR, который, кроме того, может функционировать как рецептор еще двух гормонов: плацентарного лактогена и гормона роста. Связывание любого из этих гормонов с PRLR может активировать следующие основные сигнальные пути: JAK2/STAT5 (янус-киназа 2/активатор транскрипции 5), MAPK/ERK1-2 (митоген-активируемая протеинкиназа/регулируемая внеклеточными сигналами киназа 1-2) и PI3K/AKT (фосфоинозитид-3-киназа/протеин киназы B). При этом активация этих путей зависит от гомодимеризации или гетеродимеризации PRLR с образованием различных изоформ этого рецептора [9].

Существуют две изоформы PRLR, образуемые в результате альтернативного сплайсинга: длинная изоформа (l-PRLR) и короткая изоформа (s-PRLR). Изменение соотношения изоформ PRLR в различных тканях рассматривают в качестве механизма, регулирующего клеточные функции в таких процессах, как беременность, лактация, развитие тканей, воспалительный ответ, образование опухоли [1]. Считается важным соотношение длинной и короткой изоформ PRLR в регуляции экспрессии β -казеина, являющегося одним из белков молока, о чем показано в опытах *in vitro*, где выявлена сниженная активация промотора гена β -казеина, если соотношение длинной и короткой изоформ сдвинуто в сторону s-PRLR [1].



Ген рецептора гормона роста GHR. GHR, ген рецептора гормона роста (GeneID: 2690), согласно данным NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2690>, дата обращения 14.10.2021), также известный как GHBP и GHIP, относится к семейству цитокиновых рецепторов типа I, связывает гормон роста (GH) как трансмембранный рецептор. Гормон роста, являясь многофункциональным, регулирует широкий спектр физиологических функций, включая в себя аспекты питания, роста, метаболизма липидов и углеводов, осморегуляции, воспроизводства, функции иммунной системы [3]. Вырабатывается в гипофизе и секретируется в кровоток, где связывается с GHR во многих типах клеток, вызывая выработку инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1). Связывание GH с GHR происходит через классические сигнальные пути, включая JAK-STAT, ERK, PI3K-Akt и PKC, однако молекулярная основа многофункциональности действия GHR остается неясной в отношении направления гормона роста GH в разные клетки, или изменения действий этого гормона в пределах одного и того же типа клеток [3].

Наличие экспрессии GHR в эпителиальных клетках молочной железы крупного рогатого скота позволило предположить, что GH может стимулировать экспрессию нескольких основных генов молочного белка в молочной железе, напрямую воздействуя на эпителиальные клетки и влияя на выработку молока [15]. Было показано, что гормон роста увеличивал экспрессию мРНК α S1-казеина, α S2-казеина, β -казеина и α -лактальбумина в 16–117 раз в трансфицированных клетках MAC-T, в то время как он не влиял на экспрессию κ -казеина и β -лактоглобулина [15].

Рецептор гормона роста существует в виде двух изоформ, распространенных в большинстве популяций и различающихся сохранением или исключением экзона 3: полноразмерная изоформа (fl-GHR) и изоформа с удаленным экзоном 3 (d3-GHR). Существует немного исследований, посвященных изучению экспрессии этих изоформ в различных тканях [5].

Ген рецептора лептина LEPR. LEPR, ген рецептора лептина (GeneID: 3953), согласно данным NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3953>, дата обращения 14.10.2021), так же известный как ОБР, ОБ-Р, CD295, LEP-R, LEPRD, относится к семейству цитокиновых рецепторов gp130 лептина, который является адипоцит-специфическим гормоном, участвующим в регуляции липолиза (метаболизм жиров), а также в кроветворном пути, необходимом для нормального лимфопоэза. У крупного рогатого скота LEPR, изучаемый в качестве маркерного гена-кандидата, влияющего на характеристики молочной продуктивности, описывается как картированный на хромосоме 3q33, состоящий из восемнадцати экзонов [4], экспрессируемый в большинстве тканей, включая молочные железы, влияющий на энергетический баланс [13]. Обнаруженный в исследованиях несинонимичный SNP в экзоне 20 гена LEPR, вызывающий замену треонин $\rightarrow$ метионин во внутриклеточном домене LEPR по остатку 945 (LEPR-T945M), рассматривают как причинную мутацию, влияющую на концентрацию лептина во время стельности, а также связанную с содержанием молочного жира и белка [13]. Показан изменчивый уровень экспрессии гена LEPR в молочной железе, являясь низким у телок препубертатного возраста, но значительно увеличенный у коров [14].

У млекопитающих идентифицировано шесть изоформ (LEPRa – LEPRf) гена рецептора лептина LEPR, образующихся путем альтернативного сплайсинга, среди которых так называемая длинная изоформа (LEPRb) имеет полный цитоплазматический домен и отвечает за большинство физиологических эффектов лептина [13]. LEPRb состоит из 302 аминокислотных остатков и считается основной изоформой, передающей сигнал от лептина к гипоталамусу. При этом остальные изоформы, обнаруженные во многих тканях и клетках, таких как легкие, почки, печень, селезенка и макрофаги, имеют цитоплазматические домены от 32 до 40 аминокислот. LEPRb опосредует большую часть передачи сигналов лептина через активацию множества внутриклеточных сигнальных путей, действующих согласованно, таких как JAK2 (янус-киназа 2), STAT3 (активатор транскрипции 3), PI 3-kinases (фосфоинозитид-3-киназа), MAPK (митоген-активируемая протеинкиназа), AMPK (5'АМФ-активируемая протеинкиназа) и mTOR (протеинкиназа серин-треониновой специфичности) [8], а остальные изоформы LEPR участвуют в транспорте лептина через путь MAPK с передачей более слабых сигналов, чем LEPRb, роль которых еще предстоит изучить.

Большинство мутаций в длинной изоформе LEPRb связаны с ожирением и дисфункцией гипофиза. Выявленные у мышей и человека, они вызывают патологическое ожирение, гиперфагию, метаболический синдром, а также ряд других нейроэндокринных дисфункций [11]. Так, например, у пакистанских детей с тяжелым ожирением выявленная гомозиготная мутация LEPR в сайте сплайсинга экзона 15 (с.2396-1 G> T) и нонсенс-мутация экзона 10 (с.1675 G> A) связана с нарушением сигнального пути лептин – LEPR.

Таким образом, при регуляции генов рецепторов альтернативными изоформами мРНК изменяющееся соотношение изоформ, а также мутации в них приводят к изменению клеточной реакции, вызывая множество функциональных ответов в клетке [3].

На сегодняшний день информация о функциональных мутациях в генах у крупных млекопитающих ограничена в основном людьми, проводится множество исследований по обнаружению aberrантных событий сплайсинга, которые могут быть использованы в качестве мишеней для лекарств и/или биомаркеров с целью ускорения создания новых лекарств для широкого спектра генетических заболеваний [2]. С нарушениями альтернативного сплайсинга у человека связано большое количество патологических состояний, в том числе онкологических, сердечно-сосудистых, неврологических заболеваний [2]. Таким образом, изучение функциональных мутаций в



изоформах мРНК, продуцируемых в процессе альтернативного сплайсинга, имеет как прикладное, так и фундаментальное значение [7].

Информация о влиянии исследуемых генов LEPR, PRLR, GHR и их изоформ, образующихся путем альтернативного сплайсинга, на признаки молочной продуктивности в различных популяциях крупного рогатого скота все еще является крайне ограниченной. Но уже сейчас ясно, что нарушение сигнальных путей при взаимодействии генов LEPR, PRL и GH с их рецепторами LEPR, PRLR и GHR, соответственно, может приводить к функциональным маркерным мутациям, что требует учета в методах геномной селекции молочного скота.

Работа выполнена в рамках государственного задания в сфере научной деятельности №121052600344-8.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abramicheva P. A., Smirnova O. V. Prolactin receptor isoforms as the basis of tissue-specific action of prolactin in the norm and pathology. *Biochemistry*. 2019;(84):329–345. DOI: 10.1134/S0006297919040011.
2. Akerman M., Pineda M. L. Systems and methods for analysis of alternative splicing. US Patent No. US2021280275 (09 сентября 2021).
3. Bergan-Roller H. E., Sheridan M. A. The growth hormone signaling system: insights into coordinating the anabolic and catabolic actions of growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 2018;(258):119–133. DOI: 10.1016/j.ygcen.2017.07.028.
4. De Matteis G., Scatà M. C., Grandoni F. et al. Association analyses of single nucleotide polymorphisms in the leptin and leptin receptor genes on milk and morphological traits in Holstein cows. *Journal of Animal Sciences*. 2012;2(3):174–182. DOI:10.4236/ojas.2012.23024.
5. Growth hormone receptor gene polymorphism. Spontaneous catch up growth in small for gestational age patients / N. P. Garrido et al. *Medicina (Buenos Aires)*. 2021;(81):574–580.
6. Grabski D. F., Broseus L., Kumari B. Intron retention and its impact on gene expression and protein diversity: A review and a practical guide. *WIREs RNA*. 2021;(12)16–31. DOI:10.1002/wrna.1631.
7. Khajtovich F. E., Mazin P. V. Method for quantifying the statistical analysis of alternative splicing in rnaseq data. RU Patent No. 2752663.
8. Morris D. L., Rui L. Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2009; 297(6):1247–1259. DOI:10.1152/ajpendo.00274.2009.
9. Ramos-Martínez E., Ramos-Martínez I. Molina-Salinas G., Zepeda-Ruiz W. A., Cerbon M. The role of prolactin in central nervous system inflammation. 2021;32(3):323–340. DOI:10.1515/revneuro-2020-0082.
10. Rekosh D., Hammarskjöld M. Intron retention in viruses and cellular genes: Detention, border controls and passports. *WIREs RNA*. 2018;9(3):1470. DOI:10.1002/wrna.1470.
11. Saeed S., Bonnefond A., Manzoor J. Novel LEPR Mutations in Obese Pakistani Children Identified by PCR-Based Enrichment and Next Generation Sequencing. *Obesity*. 2014;(22):1112–1117. DOI: 10.1002/oby.20667.
12. Silpa M. V., König S., Sejian V. et al. Climate-Resilient Dairy Cattle Production: Applications of Genomic Tools and Statistical Models. *Frontiers in Veterinary Science*. 2021;(8):625189. DOI:10.3389/fvets.2021.625189.
13. Soltani-Ghombavani M., Ansari-Mahyari S., Rostami M. et al. Effect of polymorphisms in the ABCG2, LEPR and SCD1 genes on milk production traits in Holstein cows. *South African Journal of Animal Science*. 2016;46(2):196–203. DOI: 10.4314/sajas.v46i2.11.
14. Szyda J., Komisarek J. Statistical modeling of candidate gene effects on milk production traits in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 2007;(90):2971–2979.
15. Zhou Y., Akers R. M., Jiang H. Growth Hormone Can Induce Expression of Four Major Milk Protein Genes in Transfected MAC-T Cells. *Journal of Dairy Science*. 2008;91(1):100–108. DOI:10.3168/jds.2007-0509.

Статья поступила в редакцию 14.10.2021; одобрена после рецензирования 19.10.2021; принята к публикации 25.10.2021.

The article was submitted 14.10.2021; approved after reviewing 19.10.2021; accepted for publication 25.10.2021.