

А. Ф. Яковлев, Н. В. Дементьева, В. П. Терлецкий

Связь молекулярно-генетических маркеров с продолжительностью использования молочных коров

Обзор

Аннотация. Имеется ряд достоверных данных о влиянии на продолжительность продуктивного использования молочных коров локусов количественных признаков с использованием анализа сцепления, а также SNP гаплотипов. Наиболее достоверные данные по выбраковке коров получены на основании исследования полиморфизма гена лептина. Следует отметить, что лептин — пептидный гормон, регулирующий энергетический обмен и развитие репродуктивной системы. Несколько полиморфных типов лептина (LEP-2470, LEP-1238, ЛЭП-963, Y7F и R25C), оказались связанными с энергетическими процессами лактогенеза, а SNP Y7F связан с накоплением энергии. Обнаружены ассоциации между полиморфными типами лептина с признаками трудности отела, продолжительностью стельности и перинатальной смертности. Имеются данные о связи между LEP-полиморфизмом и его белкового продукта с долголетием у мышей и людей. LEP-полиморфизмы можно рассматривать в качестве маркеров, которые могут использоваться в селекции на долголетие. Громадную роль в формировании здоровья и продолжительности продуктивной жизни играют гены, связанные с иммунологическими процессами в организме коров. Восприимчивость к маститу является сложным полилокусным признаком и неудивительно, локусы количественных признаков для мастита были выявлены почти на всех хромосомах крупного рогатого скота. Недавние исследования, проведенные на основе геномной оценки, позволили обнаружить регионы генома и гены, связанные с продолжительностью продуктивной жизни коров, в том числе гены SYT10, ADAMTS3, NTRK2 и SNTG1. Таким образом, проблема продолжительности продуктивной жизни коров является крайне многогранной задачей как для установления четких параметров распознавания причин, так и для разработки мероприятий при продлении сроков жизни.

Ключевые слова: молочные коровы, продолжительность жизни, геном, гены, лептин, мастит, иммунология, полигенный эффект, маркеры.

Сведения об авторах:

Яковлев Александр Федорович — д.б.н., проф., член-корреспондент РАН, зав. отделом генетики и биотехнологии ВНИИРГЖ, Санкт-Петербург, тел.: (812) 465-80-12, e-mail: afyakov@mail.ru;

Дементьева Наталия Викторовна — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной цитогенетики, ВНИИРГЖ, Санкт-Петербург, тел.: (812) 465-80-12, e-mail: dementevan@mail.ru;

Терлецкий Валерий Павлович — д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной цитогенетики, ВНИИРГЖ, Санкт-Петербург, тел.: (812) 465-80-12, e-mail: valerter@mail.ru.

Продолжительность использования молочных коров является важной проблемой в животноводстве. Использование молекулярных маркеров в селекции сельскохозяйственных животных естественно ставит вопрос о влиянии определенных генов и элементов генома на продолжительность продуктивной жизни коров и возможность моделирования селекционных подходов к повышению этого показателя. С одной стороны молочный скот является удобным объектом для подобного изучения, так как в распоряжении исследователя имеются родословные данные. Однако выживаемость жи-

вотного зависит не только от состояния предков, но во многом от условий кормления и содержания данной коровы. Поэтому в молочном скотоводстве можно различать истинное долголетие, т.е. когда фактическая вероятность выживания животного считается и функциональной долговечностью и где дополнительные эффекты, выражающие риск выбраковки коровы, независимо от ее уровня продуктивности и управления структурой стада, включены в моделирование вероятности выживания [1]. Функциональная долговечность стремительно приобретает все большее значение в качестве критерия

отбора в молочном животноводстве. Многие исследователи сделали анализ различных категорий, таких как: как признаки воспроизводства [2], состояние вымени [3], уровень инбридинга [4] и др. Анализ 124793 лактаций (75137 коров и 1586 быков) показал [5], что общая частота маститов и заболеваний конечностей (хромота) составили соответственно 17% и 16% с коэффициентом наследуемости соответственно 0,04 и 0,02. Генетические корреляции между маститом и удоем и признаков воспроизводства находились в диапазоне от 0,27 до 0,33. Генетические корреляции между маститом и хромотой с межотельным интервалом составляли 0,38 и -0,59 соответственно. Хромота существенно коррелировала с удоем (0,38), валовым белком в молоке (0,28), межотельным интервалом (0,35), числом осеменений (0,38) и продолжительностью жизни (-0,53). Оценки наследуемости мастита и хромоты была низкой, поэтому генетический прогресс при отборе будет также низким. Селекция против мастита и хромоты в качестве дополнительных признаков должна снизить заболеваемость и одновременно улучшить воспроизводство и долголетие. Тем не менее, оба признака здоровья имеют антагонистические отношения с признаками продуктивности и будут снижать генетический прогресс. Генетическая составляющая, включая связь признака долголетия и полиморфизма ДНК и генов, приобретает первостепенное значение. Наиболее распространенным подходом является моделирование накопленных данных о полигенном эффекте [6]. Представляет интерес исследование конкретных генов-кандидатов для ответа на вопрос: могут ли отдельные гены вносить заметный вклад в физиологическое формирование производства молока и продолжительности жизни. Наиболее достоверные данные по выбраковке коров получены на основании исследования полиморфизма гена лептина.

Имеется ряд подтверждений влияния полиморфных вариантов гена лептина на функциональную продолжительность жизни коров [7]. Так полиморфный вариант LEP-R25C имеет относительный риск выбраковки коров с генотипом CC в 3,14 раза выше, чем для гетерозиготных животных. Помимо LEP-R25C, также FF гомозиготы в замене LTP-Y7F имеют риск в 3,64 раза более высокий, чем YY гомозиготы, а BB гомозиготы LEP-A80V в 1,83 раза более высокий риск выбраковки, чем AA гомозигот. Различия в рисках между генотипами полиморфизма в пределах других генов (butyrophilin подсемейства 1 гена A1, BTN1A1; ацил-КоА диацилглицерин ацилтрансфераза 1 ген, DGAT1; гена рецептора лептина, LTPR; АТФ-связывающего кассетного подсемейства G элемент 2, ABCG2) намного меньше. Таким образом, пред-

ставленные результаты показывают связь между LEP-полиморфизмом и долголетием коров, убедительно подтвержденные результатами других исследований. Учитывая растущее значение функциональных признаков молочного скота, LEP-полиморфизмы следует рассматривать в качестве маркеров функционального долголетия. Следует отметить, что лептин — пептидный гормон, регулирующий энергетический обмен и развитие репродуктивной системы. Несколько полиморфных типов лептина (LEP-2470, LEP-1238, ЛЭП-963, Y7F и R25C), оказались связанными с энергетическими процессами лактогенеза, а SNP Y7F связан с накоплением энергии. Обнаружены ассоциации между полиморфными типами лептина с признаками трудности отела, продолжительностью стельности и перинатальной смертности [8]. В другой работе [9] показано, что SNP (A1457G и A59V) лептина были связаны с ростом скелета, показателями воспроизводства (UASMS1, UASMS2, A1457G, A59V) и молочной продуктивностью (A59V). Концентрации лептина в предродовом периоде коровы подвергаются значительным изменениям: они были высокими на поздних сроках беременности. Генетический анализ показал, что сочетание трех полиморфизмов, расположенных в области 135 п.н. промотора связан с концентрацией лептина. Полиморфизм ДНК интрона 2 гена лептина оказался связанным с вариацией надоя. На промоторной области гена лептина обнаружен SNP, связанный с первой послеродовой лютеиновой активностью. Другой SNP промотора лептина был связан с энергетическим балансом и потребления сухого вещества [10]. Имеются данные о связи между LEP-полиморфизмом и его белкового продукта с долголетием у мышей [11] и людей [12]. Все это свидетельствует о том, что LEP-полиморфизмы можно рассматривать в качестве маркеров, которые могут использоваться в селекции на долголетие.

Недавние исследования, проведенные на основе геномной оценки, позволили обнаружить регионы генома и гены, связанные с продолжительностью продуктивной жизни коров [13]. Наиболее заметные гены: SYT10 (synaptotagmin X, влияет на участие Ca^{2+} в экзоцитозе секреторных везикул) находится на хромосоме 5, ADAMTS3 (дезинтегрин со свойствами тромбоспондина) — на хромосоме 6, NTRK2 (рецептор нейротрофической тирозинкиназы) — на хромосоме 8 и SNTG1 (Syntrophin — гамма 1, белок адаптер, участвующий в организации субклеточной локализации белков) — на хромосоме 14 генома крупного рогатого скота. Несколько сигналов, в том числе самого высокого уровня, найденные на хромосоме 14, были расположены в регионах с некото-

рыми другими генами, что позволяет предполагать наличие иных генов, влияющих на продолжительность продуктивной жизни скота.

Громадную роль в формировании здоровья и продолжительности продуктивной жизни играют гены, связанные с иммунологическими процессами в организме коров. Количественная оценка показала ассоциации между двумя полиморфизмами толл-подобных рецепторов 2 (TLR2) и рецептора хемокинов 1 (CXCR1) с признаками здоровья молочных коров [21]. TLR4-2021 связан ($P < 0,05$) с общим выходом молочного белка и процентом жира в конце лактации ($P < 0,01$). Толл-подобные рецепторы — это класс клеточных рецепторов с одним трансмембранным фрагментом, которые распознают консервативные структуры микроорганизмов и активируют клеточный иммунный ответ и играют ключевую роль во врожденном иммунитете. Из шестнадцати полиморфизмов семь иммунных генов ассоциируется с числом соматических клеток в молоке [14].

Восприимчивость к маститу является сложным полилокусным признаком и неудивительно, что локусы количественных признаков для молочной продуктивности и мастита были выявлены почти на всех хромосомах крупного рогатого скота. Сорок четыре гена были предложены в качестве наиболее перспективных кандидатов для дальнейшего исследования уровней экспрессии, генетической изменчивости и биологические функции в формировании хозяйственных признаков [15]. В процессе геномной оценки важно эффективно идентифицировать в качестве маркеров не только гены-кандидаты, но и причинную мутацию. Учитывая, что заболевание маститом связано со множеством различных генов и клеточных путей, гены, кодирующие иммунные факторы, которые обнаруживают и устраняют болезнетворные микроорганизмы, являются важными потенциальными маркерами. Как уже отмечалось, Толл-подобный рецептор 4 (TLR4) является врожденным иммунным белком на поверхности клеток, который распознает липополисахарид грамотрицательных бактерий (14). Координация первичных механизмов защиты от патогенных микроорганизмов зависит от соответствующей экспрессии рецепторов и распознавания патогена, запускающего досрочное освобождение эффекторных молекул иммунной системы. Для анализа влияния этой системы на противодействие инфекции молочной железы охарактеризован ген, кодирующий ключевой PRR Толл-подобный рецептор 9 (TLR9), который локализован на хромосоме 22. Путем использования ПЦР в реальном времени количественно измерено количество мРНК TLR9, TLR2 и TLR4

в здоровых и инфицированных молочных железах. При мастите сильно увеличилось (от 4 до 13 раз) синтез мРНК всех этих генов, кроме TLR9. Число копий TLR2 хорошо коррелирует с результатами TLR4, указывающий на скоординированное регулирование этих двух PRR во время инфекции вымени. Их координация объясняет неожиданное наблюдение о том, что инфекции золотистого стафилококка вызывает сильное увеличение мРНК TLR4 [16]. Все это свидетельствует о значительной способности врожденной иммунной системы противодействовать маститу и влиять на продуктивную продолжительность жизни коров.

С аллелем «С» ассоциируется снижение числа соматических клеток и более высокий удой молока. В сочетании с этим геном рецептор гена TLR4 проявляет дифференциальную связь с маститом, что побудило предложить TLR4 в качестве кандидата на включение в селекционные программы для снижения заболеваемости маститами [17]. В процессе геномной оценки с частотой наступления стельности было обнаружено SNP 40 генов при этом 36 SNP были связаны с продолжительностью продуктивной жизни [18]. Это дает возможность включить эти SNP в геномные тесты воспроизводства и продолжительности жизни коров.

Ген CXCR1 кодирует рецептор хемокинов на поверхности нейтрофилов, которые связаны с противовоспалительными воздействиями цитокина интерлейкина 8 (IL8). Замена нуклеотидов SNP CXCR1-777 (G/C) приводит к замене глутамина на гистидин в положении аминокислоты в положении 245. Когда CXCR1 стимулируется IL8, эта петля участвует в связывании G-белка и кальция. CC генотип SNP CXCR1-777 ассоциированы с нарушениями миграции нейтрофилов, с нарушением производства активных форм кислорода, что приводит к увеличению случаев субклинического мастита [19].

Другие потенциальные иммунные мишени — маркеры включают полиморфизмы в кластере гена дифференцировки 14 (CD14) по домену каспазы 15 (CARD15) и IL8 генов. CD14 кодирует мембранный белок, ассоциированный на поверхности клеток, который участвует в распознавании липосахаридов в сочетании с TLR4 [20]. Из шестнадцати полиморфизмов в семи иммунных родственных генов, только CXCR1-777 (рецептор 1 хемокинового гена или рецептора 8 интерлейкина альфа), как правило, ассоциируется с генетической устойчивостью к заболеваниям на фермах.

Отмечены ассоциации между геном главного комплекса гистосовместимости BoLA — DRB3 и рядом хозяйственных признаков, включая число соматических клеток в молоке и частотой заболеваемостью маститом [21].

Вклад в долголетие молочного скота не только генетических, но и экологических, антропологических и других факторов бесспорно большой.

Определение длительности продуктивной жизни с привлечением показателей причин выбраковки увеличил наследуемость признака. При такой обработке этот показатель может достигать около 0,09. Обычно показатели наследуемости гораздо ниже и составляют для нетелей около 0,01 и для коров до 0,06 [22]. Риск для коров быть отбракованными из-за нарушения воспроизводства, заболевания маститом, несоответствия стандартам экстерьера и низкой продуктивности заметно различаются между странами. Результаты геномного анализа показывают, что около 40 SNPs связаны ($P < 0,05$) с частотой наступления стельности. Среди них гены, участвующие в функционировании эндокринной системы, клеточной сигнализации, иммунного статуса и ингибирования апоптоза. В общей сложности оказалось, что 10 генов регулируется геном эстрадиола. Кроме того, 22 SNP были связаны с оплодотворяемостью нетелей, 33 — с оплодотворяемостью коровы, 36 — с длительностью продуктивной жизни, 34 — с племенной

ценностью, 23 — с удоем, 19 — с общим выходом молочного жира, 13 — с процентом жира, 19 — с общим выходом молочного белка, 22 — с процентом белка и 13 — с числом соматических клеток [23].

Проведен анализ показателей, характеризующих степень дестабилизации генома (частота эритроцитов и лимфоцитов с микроядрами, число ядрышек на клетку) молочных коров [24]. На основе полученных данных сделан вывод, что как подъем продуктивности коров, так и сроки их использования увеличивают дестабилизацию генома и, возможно, повышают риск возникновения негативных мутаций.

Таким образом, проблема продолжительности продуктивной жизни коров является крайне многогранной задачей как для установления четких параметров распознавания причин, так и для разработки мероприятий для продления сроков жизни. Ясно, что наряду с использованием генетико-популяционных параметров хозяйственных признаков необходимо совершенствовать и внедрять молекулярные маркеры в селекционные программы.

Литература

1. Ducrocq V, Quaas R. L., Pollak E., Casella G. Length of productive life of dairy cows. // *J Dairy Sci.* 1988 — № 71 — P. 3061–3070.
2. Sewalem A., Miglior F., Kistemaker G. J., Sullivan P., VanDoormaal B. J. Relationship between reproduction traits and functional longevity in Canadian Dairy Cattle. // *J Dairy, Sci.* — 2008. — № 9. — P. 1660–1668.
3. Neerhof H. J., Madsen P., Ducrocq V. P., Vollema A. R., Jensen J., Korsgaard I. R. Relationship between mastitis and functional longevity in Danish Black and White dairy cattle estimated using survival analysis. // *J Dairy Sci.* — 2000. — № 83. — P. 1064–1071.
4. Sewalem A., Kistemaker G. J., Miglior F., VanDoormaal B. J. Analysis of inbreeding and its relationship with functional longevity in Canadian Dairy Cattle // *J Dairy Sci.* № 2006 — 89 — P. 2210–2216.
5. Pritchard T., Coffey M., Mrode R., Wall E. Genetic parameters for production, health, fertility and longevity traits in dairy cows // *Animal.* 2013. — № 7–1. — P. 34–46.
6. Ducrocq V. Two years of experience with the French genetic evaluation of dairy bulls on production-adjusted longevity of their daughters. // *Interbull Bulletin* — 1999. — № 21. — P. 60–67.
7. Joanna Szyda, Małgorzata Morek-Kopeć, Jolanta Komisarek and Andrzej Żarnecki. Evaluating markers in selected genes for association with functional longevity of dairy cattle // *BMC Genetics* — 2011. — № 12. — P. 30–36.
8. Giblin L., Butler S. T., Kearney B. M., Waters S. M., Callanan M. J. Berry D. P. Association of bovine leptin polymorphisms with energy output and energy storage traits in progeny tested Holstein-Friesian dairy cattle sires // *BMC Genet.* — 2010. — № 29–11. — P. 73–81.
9. Clempson A. M., Pollott G. E., Brickell J. S., Bourne N. E., Munce N., Wathes D. C. Evidence that leptin genotype is associated with fertility, growth, and milk production in Holstein cows. // *J Dairy Sci.* — 2011. — № 94–7. — P. 3618–3628.
10. Liefers S. C., Veerkamp R. F., Te Pas M. F., Chilliard Y., Van der Lende T. Genetics and physiology of leptin in periparturient dairy cows // *Domest Anim Endocrinol.* — 2005 — № 29–1 — P. 227–238.
11. Boghossiana S., Uenoa N., Dubeb M. G., Kalrab P., Kalraa S. Leptin gene transfer in the hypothalamus enhances longevity in adult monogenic mutant mice in the absence of circulating leptin // *Neurobiol Aging* — 2007. — 28. — P. 1594–1604.
12. Khabour O. F., Mesmar F. S., Alatoum M. A., Gharaibeh M. Y., Alzoubi K. H. Associations of polymorphisms in adiponectin and leptin genes with men's longevity // *Aging Male* — 2010 — № 13 — P. 188–193.
13. Gábor Mészáros, Sophie Eaglen, Patrik Waldmann, Johann Sölkner, A Genome Wide Association Study for Longevity in Cattle // *Open Journal of Genetics* — 2014. — № 4. — P. 46–55.

14. Akira S., Takeda K. Toll-like receptor signaling // Nat Rev. Immunol. — 2004 — № 4 — P. 499–511.
15. Ogorevc J., Kunej T., Razpet A., Dovc P. Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis // Anim Genet — 2009 — №40 — P. 832–851.
16. White S. N., Taylor K. H., Abbey C. A., Gill C. A., Womack J. E. Haplotype variation in bovine Toll-like receptor 4 and computational prediction of a positively selected ligand-binding domain // Proc Natl Acad Sci. USA — 2003 — №100 — P. 10364–10369.
17. Goldammer T., Zerbe H., Molenaar A., Schuberth H. J., Brunner R. M., Kata S. R., Seyfert H. M. Mastitis increases mammary mRNA abundance of beta-defensin 5, toll-like-receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in cattle // Clin Diagn Lab Immunol. — 2004 — № 11 — P. 174–185.
18. Sarah D. Cochran¹., John B. Cole, Daniel J. Null and Peter J. Hansen. Discovery of single nucleotide polymorphisms in candidate genes associated with fertility and production traits in Holstein cattle. BMC Genetics 2013, 14:49
19. Damaj B. B, McColl S. R., Neote K., Songqing N., Ogborn K. T., Hebert C. A., Naccache P. H.. Identification of G-protein binding sites of the human interleukin-8 receptors by functional mapping of the intracellular loops. FASEB J 1996, 10:1426–1434.
20. Ibeagha-Awemu E. M., Lee J. W., Ibeagha A. E., Zhao X: Bovine CD14 gene characterization and relationship between polymorphisms and surface expression on monocytes and polymorphonuclear neutrophils. BMC Genet 2008, 9:50
21. Christine Beecher, Mairead Daly, Stuart Childs, Donagh P Berry, David A Magee, Tommie V McCarthy and Linda Giblin, Polymorphisms in bovine immune genes and their associations with somatic cell count and milk production in dairy cattle. BMC Genetics 2010, 11:99.
22. Roxstrom A., Ducrocq V., Strandberg E. Survival analysis of longevity in dairy cattle on a lactation basis // Genet. Sel. Evol. // 2003 — 35 — P. 305–318.
23. Pritchard T., Coffey M., Mrode R., Wall E. Genetic parameters for production, health, fertility and longevity traits in dairy cows // Animal — 2013 — №7–1 — P. 34–46.
24. Яковлев А. Ф., Косякова Г. П., Погорельский И. А. Дестабилизация генома коров в связи с продолжительностью использования // Бюллетень ГНУ ВНИИГРЖ № 150 — С.24–27.

Yakovlev A. F., Dementeva N. V., Terletsky V. P.

Genetic nature of hereditary diseases cattle and molecular genetic methods of diagnosis

Review

Abstract. *There are a number of reliable data on the effect of the duration of the productive use of dairy cows quantitative trait loci using linkage analysis and SNP haplotypes. The most reliable data on the culling of cows and based on the study of leptin gene polymorphism. It should be noted that leptin — a peptide hormone that regulates energy metabolism and the development of the reproductive system. Several polymorphic types leptin (LEP-2470, LEP-1238, LEP-963, Y7F and R25C), were associated with the energy processes lactogenesis and SNP Y7F associated with the accumulation of energy. Found an association between leptin polymorphic types with signs of calving difficulty, duration of pregnancy and perinatal mortality. There is evidence of links between LEP-polymorphism and its protein product with longevity in mice and humans. LEP-polymorphisms can be regarded as a marker that can be used in selection longevity great role in the formation of the health and life expectancy productive play genes associated with the immunological processes in organism cows. Susceptibility to mastitis is a complex multi-locus trait and it is not surprising quantitative trait loci for mastitis were detected in almost all the chromosomes of cattle. Recent studies based on genomic evaluation have revealed regions of the genome and genes related to length of productive life of cows, including genes SYT10, ADAMTS3, NTRK2 and SNTG1. Thus, the problem of the length of productive life of cows is extremely multi-faceted challenge for establishing clear recognition parameters causes and to develop measures for extending life.*

Keywords: dairy cows, longevity, gene, genes, leptin, mastitis, immunology, polygenic effect markers.

Authors:

Yakovlev A. F. — Ph.D., prof., Head. Department of Genetics and Biotechnology RRIFAGB, e-mail: afyakov@mail.ru;

Dementieva N. V. — Ph.D, Laboratory of Molecular Cytogenetics, RRIFAGB, e-mail: dementevan@mail.ru;

Terletskii V. P. — Ph.D., prof., Laboratory of Molecular Cytogenetics, RRIFAGB, e-mail: valerter@mail.ru, tel.: [812] 465-80-12