

А. А. Филипченко, М. С. Форнара, О. В. Костюнина, А. А. Сермягин

Разработка тест-системы для диагностики наследственной аномалии *BMS*, ассоциированной с бесплодием быков-производителей симментальской породы

Аннотация. Повышение уровня гомозиготности в породах крупного рогатого скота обуславливает возрастающее негативное влияние LoF-мутаций (LoF — нарушение функции). Целью работы была разработка молекулярно-генетической тест-системы диагностики LoF-мутации в гене *TMEM95*, известной под названием *BMS* (Bovine male subfertility), то есть субфертильность быков-производителей, ассоциированная с полным их бесплодием или неполноценностью развития сперматозоидов. В ходе исследований создали серию референтных образцов ($n=50$) с известными генотипами по *BMS*. Рутинные исследования проводили с использованием ПЦР-ПДРФ анализа. В результате проведенного генотипирования 180 коров и 110 быков-производителей было выявлено 16 скрытых носителей мутации (5,5%), в том числе 11 коров и 5 быков. Принимая во внимание относительно высокую частоту встречаемости *BMS*, предложенная тест-система может быть рекомендована для массового скрининга племенного скота симментальской и родственных ему пород в России с целью контроля распространения и элиминации скрытых носителей данного генетического заболевания.

Ключевые слова: наследственная аномалия, бык-производитель, бесплодие, симментальская порода.

Авторы:

Анна Александровна Филипченко — кандидат сельскохозяйственных наук, научный сотрудник лаборатории молекулярных основ селекции; e-mail: filipchenko-90@mail.ru;

Форнара Маргарет Сержевна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярных основ селекции; e-mail: margaretfornara@gmail.com;

Костюнина Ольга Васильевна — доктор биологических наук, руководитель лаборатории молекулярных основ селекции; e-mail: kostolan@yandex.ru;

Сермягин Александр Александрович — кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории популяционной генетики и разведения животных; e-mail: rorggen@vij.ru.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста», 142132, Московская область, Городской округ Подольск, поселок Дубровицы, д. 60.

Введение. Генетическое совершенствование пород сельскохозяйственных животных предусматривает международный обмен генофондом с целью использования лучших мировых селекционных достижений. Однако завоз племенного материала из-за рубежа сопряжен с неконтролируемым появлением и распространением наследственных аномалий, способных нанести существенный вред развитию животноводства и поставить под угрозу биологическую безопасность страны [1; 2]. Молекулярно-генетические исследования крупного рогатого скота позволяют направлять и контролировать процессы селекции в племенных стадах. Для повышения продуктивности, как правило, используют ограниченное число выдающихся быков-производителей. Поэтому роль одного животного в распространении определенных полиморфных

типов генов и генетических дефектов значительно повышается. Это приводит, с одной стороны, к снижению гетерозиготности стада, а с другой — к насыщению популяций летальными мутациями [3; 4].

В последнее время особое значение приобретает поиск и идентификация ДНК-маркеров, обуславливающих возникновение генетических аномалий и проблем с фертильностью. Диагностика LoF-мутаций (LoF — loss of function), ассоциированных с летальными наследственными заболеваниями, является одним из основных элементов в современной системе генетического мониторинга популяций крупного рогатого скота. Возрастание роли LoF-мутаций в снижении фертильности коров связывают с постоянным ростом уровня гомозиготности. Считается, что низкий уровень

генетического разнообразия большинства молочных пород является следствием их происхождения от ограниченного числа родоначальников. Это ответ на проведение жесткой селекции крупного рогатого скота по ограниченному числу признаков молочной продуктивности и интенсивное использование искусственного осеменения коров относительно небольшим числом выдающихся быков-производителей [5; 6].

Одним из основных факторов, определяющих эффективность молочного животноводства, является уровень воспроизводства стада. Однако в последние десятилетия во всем мире наблюдается стойкая тенденция к снижению воспроизводительной способности коров, и эта проблема становится одной из главных в современном молочном животноводстве. До недавнего времени в качестве определяющего негативного фактора рассматривали рост молочной продуктивности.

Экономическая значимость летальных генетических дефектов обусловлена, прежде всего, влиянием на фертильность коров, чем собственно на гибель плода. Селекционное значение имеют те дефекты, носителями которых служат интенсивно используемые быки-производители, что приводит к постепенному росту частоты встречаемости скрытых носителей среди коров, а, следовательно, и к повышению вероятности спаривания двух скрытых носителей и, тем самым, появлению с 25%-ной вероятностью плодов, несущих гомозиготный по летальному аллелю генотип [1; 7; 8].

Симментальская порода крупного рогатого скота по численности занимает в России третье место (7,09%), уступая голштинской черно-пестрой масти (13,91%) и черно-пестрой породе (54,19%) [9]. Так, в симментальской породе идентифицирован ряд генетических дефектов, одним из которых является субфертильность быков — BMS (*Bovine male subfertility*), обусловленная LoF-мутацией в гене, кодирующем трансмембранный белок 95 (TMEM95) [10].

Генетическая аномалия BMS локализована в позиции 652856 на ВТА19 (*rs378652941*, с.483C>A, *p.Cys161X*, *Chr19: 27,689,622 bp*). TMEM95 кодирует высоко консервативный трансмембранный белок типа I, состоящий из 183 аминокислот с предполагаемым внеклеточным сигнальным пептидом, трансмембранным доменом длиной 23 аминокислоты (позиции с 153 до 175) и внутриклеточным С-терминальным доменом из 8 аминокислот. Вследствие мутации с.483C>A образуется стоп-кодон, который локализуется в последовательности предполагаемого трансмембранного домена и укорачивает протеин на 22 аминокислоты [10; 11; 12].

Вредное влияние данной мутации на фертильность быков заключается в снижении оплодотворяющей способности семени быков-носителей. Зарубежными учеными были проведены исследования, результаты которых доказывают, что TMEM95 — белок, находящийся на поверхности сперматозоидов, вероятно вовлеченный во взаимодействие сперматозоида с оболочками яйцеклетки. TMEM95 участвует в событиях, которые происходят перед связыванием с ZP (*Zona pellucida*) — прозрачной эластичной гликопротеиновой оболочкой, окружающей яйцеклетку и необходим для того, чтобы сперма нормально взаимодействовала с областями ооцита и, в конечном счете, для достижения оплодотворения [13].

Иммуногистохимические исследования свидетельствовали о том, что трансмембранный белок TMEM95 располагается на поверхности спермиев фертильных животных, тогда как отсутствует у сперматозоидов субфертильных быков-производителей. Эякуляты этих производителей имеют нормальную концентрацию, морфологию, жизнеспособность и подвижность сперматозоидов. Однако только 1,7% из 35671 осеменений от этих быков приводили к стельности. Таким образом, гомозиготные быки почти полностью бесплодны, у гетерозиготных быков и коров-носительниц снижена воспроизводительная способность. Причиной бесплодия гомозиготных быков является затрудненное или невозможное проникновение спермиев в яйцеклетку [10].

Анализ родословных показал, что мутация в TMEM95 происходит от родоначальника данной аномалии быка-производителя HAXL DE 09 79317838 симментальской породы, который родился 12 марта 1966 года в Германии. Частота встречаемости BMS в популяции симментальского скота — 7,2% [10; 11].

Цели и задачи. Цель исследования заключалась в разработке тест-системы, предназначенной для идентификации носителей гаплотипа BMS и проведении его предварительного скрининга в популяции скота симментальской породы.

Методы. С целью оценки распространения носителей среди племенного поголовья симментальской породы выполнили генотипирование 171 быков и 334 коров, принадлежащих различным племенным предприятиям Московской, Орловской, Воронежской, Липецкой, Калужской областей, Хакасии, Татарстана и Республики Казахстан.

Результативность разработанной тест-системы оценивали посредством сравнения результатов генотипирования референтных образцов.

На первом этапе была создана серия референтных образцов с известными генотипами по BMS

($n=50$). С этой целью из проб ткани (ушной выщип, $n=25$) и спермы ($n=25$) быков и коров симментальской породы выделяли ДНК с использованием набора реагентов для выделения геномной ДНК «ДНК-Экстрас-2» (компания «Синтол», Россия) и колонок Nexttec (Nexttec Biotechnologie GmbH, Германия) в соответствии с рекомендациями производителей. Референтные генотипы генерировали посредством прямого определения последовательности в области мутации методом пиросеквенирования. С этой целью проводили амплификацию фрагмента длиной 170 п.о., содержащего мутацию, с использованием праймеров BMS_1_Руго и BMS_2_Руго_Bio (мечен биотином) с последующим отжигом зонда BMS_Zond и пиросеквенированием. Для пиросеквенирования использовали базовую последовательность TGC/ACGACT, где C/A — мутлируемый нуклеотид, T, C — контрольные нуклеотиды.

Анализ последовательности *TMEM95* в области мутации показал, что последняя приводит к появлению сайта рестрикции эндонуклеазы *Hpy188I* (последовательность узнавания TCN↓GA), поэтому в качестве базового метода для моделирования тест-системы определения полиморфизма *TMEM95* был выбран метод полимеразной цепной реакции с последующим анализом полиморфизма длин рестрицированных фрагментов (ПЦР-ПДРФ). Подбор праймеров осуществляли с использованием программного обеспечения Primer3web, v. 3.0.0 [14]. Амплификацию проводили в конечном объеме 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1НПЦР буфер (16,6 мМ (NH₄)₂SO₄; 67,7 мМ Трис — HCl, pH=8,8; 0,1 (v/v) Tween 20), 1,5 мМ MgCl₂, 200 мкМ дНТФ, 20 пмоль каждого из праймеров, 1 Ед Taq-полимеразы (Диалат Лтд., Россия) и 1 мкл тестируемой ДНК (50–500 нг/мкл). По завершении ПЦР проводили гидролиз продуктов реакции с использованием эндонуклеазы *Hpy188I* (New England Biolabs, США). Продукты ПЦР-ПДРФ-анализа разделяли посредством электрофореза в 3% агарозном геле с добавлением бромистого димидия и визуализировали под ультрафиолетовым светом. Для идентификации длин фрагментов использовали молекулярный маркер длины 50 п.н. (ООО «Биосан», Россия).

Результаты. Теоретически смоделированные гистограммы и результаты прямого определения последовательности *TMEM95* в области мутации посредством пиросеквенирования представлены на рис. 1.

Анализ теоретически смоделированных гистограмм и результатов прямого определения последовательности *TMEM95* в области мутации посредством пиросеквенирования показал (рис. 1), что генотипу CC соответствует наличие в позиции 3 целевой последовательности пика С, равного по высоте контрольному пику G в позиции 2, и отсутствие пика А в позиции 4.

Генотипу СА соответствует наличие двух равных по высоте пиков в позициях 3 и 4 целевой последовательности. Созданная серия референтных образцов ($n=50$) включала 14 образцов с генотипом AC (скрытый носитель BMS) и 36 образцов с генотипом CC (не носитель). Генотип AA является летальным и поэтому не может быть выявлен среди взрослых животных.

В таблице 1 представлены результаты исследования частоты встречаемости аллелей и генотипов гена *TMEM95* в группе коров и быков

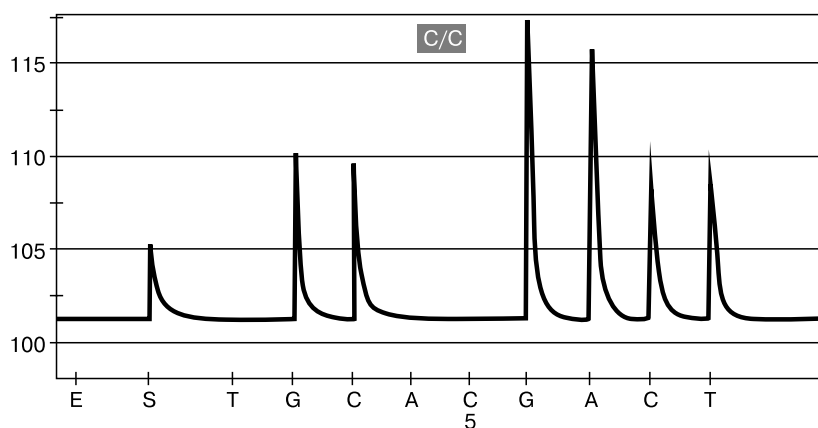


Рис. 1. Результаты генотипирования животных по *TMEM95* с использованием метода пиросеквенирования (генотип CC)

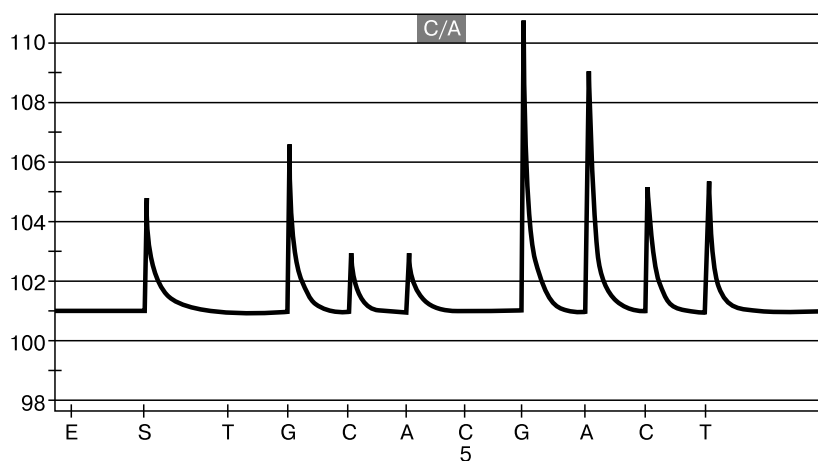


Рис. 2. Результаты генотипирования животных по *TMEM95* с использованием метода пиросеквенирования (генотип CA)

симментальской породы. В исследуемых группах животных не был диагностирован гомозиготный вариант АА, частота генотипа АС составила 5,3 и 5,9% в группах быков и коров, соответственно, в среднем по выборке — 5,7%. Частота встречаемости аллеля А фиксировалась на уровне 0,026 и 0,030 у быков и коров, соответственно и в среднем по исследованной выборке составила 0,029.

На рисунке 3 показаны результаты ПЦР-ПДРФ анализа вариантов гена *TMEM95* с использованием разработанной тест-системы.

Проанализировав родословные гетерозиготных животных-носителей, мы пришли к выводу о том, что они относятся к следующим генеалогическим линиям, которые находят свое распространение в России: Хонига 803610032, Редада

711620016730, Салата 979, Ромулуса 929189864, Неолита 8593, Флориана 374, Фасадника 642. Наследование гаплотипа у некоторых животных, принадлежащих голштинским линиям, произошло с материнской стороны предков симментальской породы, которые имели зарубежное происхождение и на момент исследований отсутствовали в регистрационной базе данных австрийских заводчиков крупного рогатого скота [15].

Выводы. Проведенные исследования продемонстрировали эффективность разработанной тест-системы в выявлении животных-носителей BMS. Исходя из данного факта, необходимо проводить мониторинг генетических заболеваний с целью предотвращения распространения аномалий в популяциях крупного рогатого скота симментальской породы. Основным способом решения проблемы использования таких животных может стать подбор, исключающий спаривание быков-производителей — скрытых носителей BMS с коровами и телками, потомками скрытых носителей этого же генетического дефекта, а также обязательная ДНК-диагностика коров быкопроизводящей группы и ремонтных бычков.

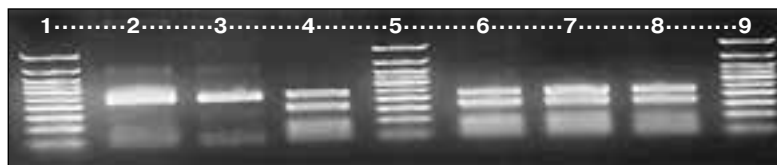


Рис. 3. Результаты генотипирования животных по *TMEM95* с использованием тест-системы на основе ПЦР-ПДРФ. (дорожка 1, 5, 9 — маркер молекулярного веса; 2, 3 — вариант СС; 4, 6, 7, 8 — вариант АС)

Таблица 1. Распределение частоты встречаемости вариантов гена *TMEM95*

Группа	Количество	Частота генотипов, %		Частота аллелей	
		СС	АС	С	А
Быки	171	94,7	5,3	0,973	0,026
Коровы	334	94,1	5,9	0,970	0,030
Всего	505	94,3	5,7	0,971	0,029

Исследования проведены в рамках выполнения задания Федерального агентства научных организаций (ФАНО) № АААА-А18-118021590138-1 в 2018 году в отделе биотехнологии и молекулярной диагностики животных ВИЖ им. Л. К. Эрнста

Литература

1. Гладырь Е. А. Молекулярные методы в диагностике заболеваний и наследственных дефектов сельскохозяйственных животных / Е. А. Гладырь [и др.] // Зоотехния. — 2009. — № 8. — С. 26–27.
2. Филипченко, А. А., Сельцов, В. И. Разработка системы генетического мониторинга наследственных аномалий признаков репродукции быков-производителей симментальской породы / А. А. Филипченко, В. И. Сельцов // В книге: Молодежные научно-инновационные проекты Московской области: Тезисы Девятой научно-практической конференции. — 2015. С. 66–68.
3. Никифорова Е. Г. Мониторинг племенного крупного рогатого скота на скрытые генетические дефекты и типы гена каппа-казеина / Е. Г. Никифорова, Н. В. Дементьева, А. Ф. Яковлев // Достижения науки и техники АПК. — 2010. — № 4. — С. 68–69.
4. Четвертакова Е. В. Мониторинг генетических заболеваний в популяции крупного рогатого скота Красноярского края / Е. В. Четвертакова, А. Е. Луценко // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. — 2012. — № 6. — С. 120–126.

5. Зиновьева Н. А. Гаплотипы фертильности голштинского скота / Н. А. Зиновьева // Сельскохозяйственная биология. — 2016. — Т. 51. — № 4. — С. 423–435.
6. Романенкова О. В. Разработка тест-системы для диагностики гаплотипа фертильности крупного рогатого скота ННЗ, ассоциированного с ранней эмбриональной смертностью / О. В. Романенкова [и др.] // Достижения науки и техники АПК. — 2015. — № 11. — Т. 29. — С. 91–94.
7. Зиновьева Н. А. Моногенные наследственные дефекты и их роль в воспроизводстве / Н. А. Зиновьева, Н. И. Стрекозов, Г. В. Ескин, И. С. Турбина, И. Н. Янчуков, А. Н. Ермилов // Животноводство России. — 2015. — № 6. — С. 30–31.
8. Зиновьева Н. А. Роль ДНК-диагностики в контроле и элиминации рецессивных наследственных аномалий сельскохозяйственных животных / Н. А. Зиновьева, Е. А. Гладырь, В. Р. Харзинова, О. В. Костюнина, М. В. Покровская, Н. Г. Друшляк, Я. А. Кабицкая // Достижения науки и техники АПК. — 2012. — № 11. — С. 37–40.
9. Ежегодник по племенной работе в молочном скотоводстве в хозяйствах Российской Федерации (2016), Москва: ВНИИплем. — С. 5, 84.
10. Интернет-ресурс: <http://omia.angis.org.au/OMIA001902/9913/>. [Дата обращения 10.07.2017 г.].
11. Интернет-ресурс: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TMEM95>. [Дата обращения 08.08.2017 г.].
12. Pausch H. A Nonsense Mutation in TMEM95 Encoding a Nondescript Transmembrane Protein Causes Idiopathic Male Subfertility in Cattle / H. Pausch [et al.] // PLoS Genet. 2014. 10(1): e1004044. (doi:10.1371/journal.pgen.1004044).
13. B. Fernandez-Fuertes A. A 4 subfertility in bulls carrying a nonsense mutation in tmem95 is due to failure to penetrate the zona pellucida / B. Fernandez-Fuertes, S. Kulle B and P. Lonergan // Reproduction, Fertility and Development 29(1) 109-110. (<https://doi.org/10.1071/RDv29n1Ab4> Published: 2 December 2016).
14. Интернет-ресурс: <http://primer3.ut.ee/>. [Дата обращения 17.10.2017 г.].
15. Интернет-ресурс: http://cgi.zar.at/cgi-bin/zv_default.pl [Дата обращения 12.07.2018 г.].

Filipchenko A., Fornara M. Kostyunina O., Sermyagin A.

Development of test system for diagnostics of hereditary anomaly *BMS* associated with Simmental bulls' infertility in Russia

Abstract. *An increase in the level of homozygosity in cattle breeds causes an increasing negative influence of LoF mutations (LoF-function disruption). The aim of the work was the development of a molecular genetic test system for the diagnosis of LoF mutation in the TMEM95 gene, known as BMS (Bovine male subfertility), that is, the subfertility of bulls, associated with complete infertility or inferiority of sperm development. During the research, a series of reference samples (n=50) with known BMS genotypes was created. Routine studies were carried out using PCR-RFLP analysis. As a result of the genotyping of 180 cows and 110 breeding bulls, 16 hidden mutation carriers (5.5%), including 11 cows and 5 bulls, were identified. Taking into account the relatively high incidence of BMS, the proposed test system can be recommended for mass screening of Simmental and related breeds in Russia in order to control the spread and elimination of hidden carriers of this genetic disease.*

Key words: hereditary anomaly, bull-producer, infertility, Simmental breed.

Authors:

Filipchenko A. — PhD (Agr. Sci), junior researcher; e-mail: filipchenko-90@mail.ru;

Fornara M. — PhD (Biol. Sci); e-mail: margaretfornara@gmail.com;

Kostyunina O. — Dr. Habil (Biol. Sci), head of laboratory; e-mail: kostolan@yandex.ru;

Sermyagin A. — PhD (Agr. Sci), leading researcher, Head of Population Genetics and Animal Breeding Laboratory, e-mail: popgen@vij.ru.

L. K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, Dubrovitz Estate, Podolsk District, Moscow Region, Podolsk 142132, Russia.

References

1. Gladyr', E. A. Molecular methods in the diagnosis of diseases and hereditary defects of farm animals / E. A. Gladyr' [i dr.] // Zootekhnika. — 2009. — № 8. — P. 26–27.
2. Filipchenko, A. A., Sel'cov, V. I. Development of a system for genetic monitoring of hereditary anomalies signs of reproduction of Simmental breed sires / A. A. Filipchenko, V. I. Sel'cov // In the book: Youth research and innovation projects of the Moscow region: Abstracts of the Ninth Scientific Practical Conference. — 2015. P. 66–68.
3. Nikiforova, E. G., Dement'eva, N. V., YAKovlev, A. F. Monitoring of breeding cattle for hidden genetic defects and types of kappa-casein gene / E. G. Nikiforova, N. V. Dement'eva, A. F. YAKovlev // Dostizheniya nauki i tekhniki APK. — 2010. — № 4. — P. 68–69.
4. CHetvertakova, E. V., Lushchenko, A. E. Monitoring of genetic diseases in the cattle population of the Krasnoyarsk Region / E. V. CHetvertakova, A. E. Lushchenko // Vestnik Krasnoyarskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. — 2012. — № 6. — P. 120–126.
5. Zinov'eva, N. A. Haplotypes of fertility of Holstein cattle / N. A. Zinov'eva // Sel'skohozyajstvennaya biologiya. — 2016. — tom 51. — № 4. — P. 423–435.
6. Romanenkova, O. V. Development of a test system for the diagnosis of the haplotype of cattle fertility HH3 associated with early embryonic mortality / O. V. Romanenkova [i dr.] // Dostizheniya nauki i tekhniki APK. — 2015. — №11. — t. 29. — P. 91–94.
7. Zinov'eva, N. A. Monogenic hereditary defects and their role in reproduction / N. A. Zinov'eva, N. I. Strekozov, G. V. Eskin, I. S. Turbina, I. N. YANCHukov, A. N. Ermilov // ZHivotnovodstvo Rossii. — 2015. — № 6. — P. 30–31.
8. Zinov'eva, N. A. The role of DNA diagnostics in the control and elimination of recessive hereditary anomalies of farm animals / N. A. Zinov'eva, E. A. Gladyr', V. R. Harzinova, O. V. Kostyunina, M. V. Pokrovskaya, N.G. Drushlyak, YA.A. Kabickaya // Dostizheniya nauki i tekhniki APK. — 2012. — № 11. — P. 37–40.
9. Yearbook on breeding in dairy cattle breeding in the farms of the Russian Federation (2016), Moscow: Vniiplem. — P. 5, 84.
10. Pausch H. A Nonsense Mutation in TMEM95 Encoding a Nondescript Transmembrane Protein Causes Idiopathic Male Subfertility in Cattle / H. Pausch [et al.] // PLoS Genet. 2014. 10(1): e1004044. (doi:10.1371/journal.pgen.1004044).
11. Internet-resurs: <http://omia.angis.org.au/OMIA001902/9913/>. [Data obrashcheniya 10.07.2017 year]
12. Internet-resurs: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TMEM95>. [Data obrashcheniya 08.08.2017 year].
13. B. Fernandez-Fuertes A., S. Külle B and P. Lonergan. A 4 subfertility in bulls carrying a nonsense mutation in tmem95 is due to failure to penetrate the zona pellucida // Reproduction, Fertility and Development 29(1) 109–110. (<https://doi.org/10.1071/RDv29n1Ab4> Published: 2 December 2016).
14. Internet-resurs: <http://primer3.ut.ee/>. [Data obrashcheniya 17.10.2017 year].
15. Internet-resurs: http://cgi.zar.at/cgi-bin/zv_default.pl [Data obrashcheniya 12.07.2018 year].