

УДК 575.827.5

РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *PANE1* В ФОРМИРОВАНИИ РЕПРОДУКТИВНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У СВИНЕЙ

© 2014 г. Н.С. Юдин¹, Р.Б. Айтназаров¹, С.П. Князев², В.А. Бекенев³,
Ю.В. Подоба⁴, А.Б. Бердибаева⁵, М.И. Воевода^{1,6}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия, e-mail: yudin@bionet.nsc.ru;

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия;

³ Государственное научное учреждение Сибирский научно-исследовательский институт животноводства, Новосибирск, Россия;

⁴ Институт разведения и генетики животных Национальной академии аграрных наук Украины, с. Чубинское, Бориспольский р-н, Киевская область, Украина;

⁵ Институт биотехнологии Национальной академии наук Кыргызской Республики, Бишкек, Кыргызская Республика;

⁶ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Научно-исследовательский институт терапии Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 2 сентября 2013 г. Принята к публикации 1 октября 2013 г.

У диких и лабораторных животных показано существование компромисса между репродуктивным успехом и иммунитетом в результате ограниченности энергетических ресурсов организма. Поэтому искусственный отбор сельскохозяйственных животных на усиление репродуктивных признаков может сопровождаться снижением иммунного ответа. Ранее были показаны положительная ассоциация однонуклеотидного полиморфизма (ОНП) гена *PANE1*, кодирующего минорный антиген гистосовместимости, с иммунологическими показателями крови и отрицательная ассоциация с массой при рождении у поросят породы ландрас (Huang *et al.*, 2010). Целью работы были определение частоты ОНП в гене *PANE1* у домашних свиней и диких кабанов, а также анализ его ассоциации с рядом репродуктивных показателей у свиней крупной белой породы. По частоте редкого аллеля *G* гена *PANE1* дикие кабаны (11,8 %) и домашние свиньи породы ландрас (12,2 %) и крупная белая (20,0 %) достоверно не различались между собой. Носительство генотипа *CG* у свиноматок приводило к снижению числа живых поросят и массы гнезда при рождении.

Ключевые слова: свинья, крупная белая порода, дикий кабан, *Sus scrofa*, ген *PANE1*, однонуклеотидный полиморфизм, ассоциация, репродуктивный признак, иммунитет.

Ассоциация полиморфизма ДНК генов, кодирующих белки иммунной системы, с репродуктивными признаками сельскохозяйственных животных может быть рассмотрена в двух аспектах. Во-первых, иммунный ответ может положительно коррелировать с репродуктивными признаками, поскольку повышение продуктивности при разведении в неволе при воздействии специфического пресса паразитов,

вероятно, будет происходить только у генетически устойчивых к паразитам животных. Во-вторых, корреляция может быть отрицательной, поскольку отбор на усиление репродуктивных признаков может приводить к снижению иммунного ответа за счет ограниченности энергетических ресурсов организма (Hamilton, Zuk, 1982; Folstad, Karter, 1992; Мошкин и др., 2003; van der Most *et al.*, 2011).

К сожалению, в имеющихся работах по анализу ассоциаций генов иммунной системы с репродуктивными признаками сельскохозяйственных животных авторы практически не исследовали показатели иммунного ответа. Так, показана ассоциация однонуклеотидного полиморфизма (ОНП) в гене лимфоидного фактора *LEF1* с числом сосков у свиней (Tetzlaff *et al.*, 2009). У коров обнаружены ассоциации с надоями и количеством молочного белка ОНП в гене хемокина *CCL2* (Leyva-Baca *et al.*, 2007), а также ОНП в гене caspase recruitment domain 15 (*CARD15*) (Pant *et al.*, 2007). Другие авторы обнаружили ассоциации показателей молочной продуктивности у коров с ОНП в генах: Toll-like Receptor 4 (*TLR-4*), chemokine receptor 1 (*CXCR1*), *CD14* и serum protease inhibitor (*SERPINA1*) (Beecher *et al.*, 2010). ОНП полиморфизм в промоторе гена *TNFalpha* может влиять на распределение репродуктивных показателей коровы в ходе лактации в зависимости от пола теленка (Yudin *et al.*, 2013).

Нам известна единственная работа (Huang *et al.*, 2010), в которой показана ассоциация замены $C \rightarrow G$ в первом интроне гена, ассоциированного с пролиферацией ядерного элемента (Proliferation Associated Nuclear Element, *PANE1*) с массой поросят при рождении и некоторыми иммунологическими показателями крови у свиней. Ген *PANE1* был идентифицирован благодаря его высокой экспрессии в клетках молочной железы мыши, трансформированных бета-катенином (Renou *et al.*, 2003). Транскрипция гена *PANE1* у человека в результате альтернативного сплайсинга и наличия множественных стартов транскрипции приводит к экспрессии 11 изоформ мРНК (Brickner *et al.*, 2006). Вариант **c** кодирует самую длинную изоформу размером 180 аминокислотных остатков. Вариант **k** кодирует короткую изоформу размером 58 аминокислотных остатков, в которой отсутствуют 122 аминокислотных остатка с N-конца (экзоны с 1 по 5). Экспрессия транскрипта с гена *PANE1* была обнаружена после активации *in vivo* и *in vitro* в В- и Т-лимфоцитах человека, а также в клетках ряда опухолей (лейкемии, лимфомы и клеточные линии опухолевого происхождения) (Bierie *et al.*, 2004). Транскрипт **k** кодирует экспрессирующийся в покоящихся В-клетках минорный антиген гистосовместимости, кото-

рый может распознаваться цитотоксическими Т-лимфоцитами (Brickner *et al.*, 2006).

Целью работы было определение частоты генотипов и аллелей ОНП $C \rightarrow G$ в первом интроне гена *PANE1* у домашних свиней и диких кабанов, а также анализ ассоциации этого полиморфизма с рядом репродуктивных показателей у свиней крупной белой породы.

Образцы крови диких кабанов, представляющих разные подвиды *Sus scrofa* L., получены из России (Воронежский биосферный заповедник), Украины (Николаевская область, Карпаты) и Киргизии (Чуйская долина). Образцы крови свиней крупной белой породы получены из Новосибирской области, ЗАО АПК «Иня»; породы ландрас – из ОАО «Кудряшовское» и Экспериментального хозяйства ИЦиГ СО РАН. Данные по репродуктивным показателям свиноматок крупной белой породы были взяты из учетных карточек. Геномную ДНК выделяли стандартным методом протеолитической обработки с последующей экстракцией фенолом. Генотипирование ОНП маркера в гене *PANE1* проводили методом ПЦР-ПДРФ (Huang *et al.*, 2010). ОНП создает сайт для эндонуклеазы рестрикции BseP I («Сибэнзим», Россия). После рестрикции 213 п.н. ампликон либо оставался неразрезанным (аллель **C**), либо разрезался на фрагменты 120 п.н. и 93 п.н. (аллель **G**). Для статистической обработки данных использовали пакет программ STATISTICA 8.0. Проверку отклонения распределения генотипов от равновесия Харди–Вайнберга и сравнение частот аллелей проводили с помощью критерия χ^2 . Оценку влияния ОНП маркера гена *PANE1* на репродуктивные показатели проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Поскольку от каждой свиноматки получены от 2 до 9 опоросов, количество генотипов при дисперсионном анализе превышало число животных.

Методом ПЦР-ПДРФ были определены генотипы ОНП в гене *PANE1* у 151 особи диких кабанов трех подвидов и домашних свиней двух пород (рис.). Дикие кабаны принадлежали к трем подвидам *Sus scrofa*: *S. s. scrofa* (Россия), *S. s. attila* (Украина) и *S. s. nigripes* (Киргизия). Однако, поскольку частоты аллелей и генотипов ОНП гена *PANE1* у разных подвидов дикого кабана, а также у домашних свиней породы ландрас из разных хозяйств достоверно не раз-

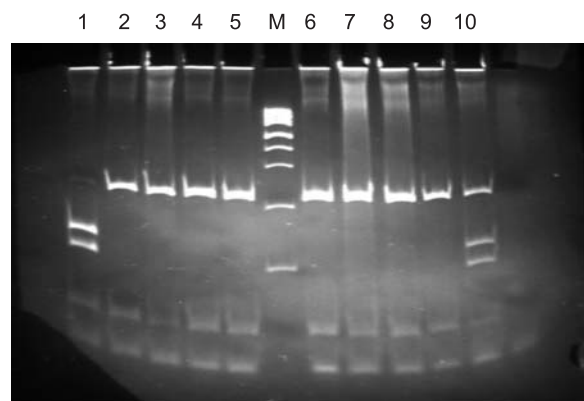


Рис. Генотипирование методом ПЦР–ПДРФ ОНП маркера в гене *PANE1*.

Анализ продуктов рестрикции проводили методом вертикального геля-электрофореза в 4 %-м полиакриламидном геле.

Дорожка 1 – генотип GG, дорожка 10 – генотип CG, дорожки 2–5 и 6–9 – генотип CC, М – маркеры молекулярного веса ДНК от 100 до 1000 п.н. с шагом 100 п.н.

личались, для дальнейшего анализа они были объединены (табл. 1). Распределение генотипов во всех изученных группах существенно не отличалось от равновесия Харди–Вайнберга. Нами не было обнаружено достоверных различий в частоте редкого аллеля *G* гена *PANE1*

у диких кабанов и домашних свиней породы ландрас и крупная белая. Полученная нами частота аллеля *G* у свиней породы ландрас из России (12,2 %) существенно ниже частоты этого же аллеля у свиней породы ландрас из Китая (34,7 %) (Huang *et al.*, 2010). Однако частоты генотипов в китайской популяции достоверно отклонялись от распределения Харди–Вайнберга из-за избытка гетерозигот. Наблюдаемое расхождение в популяционных частотах ОНП может быть связано с отбором в пользу гетерозигот в китайской популяции.

Высокая частота редкого аллеля *G* гена *PANE1* у свиней крупной белой породы (20,0 %) позволила провести анализ влияния этого полиморфизма на ряд репродуктивных показателей у свиноматок (табл. 2). Поскольку порядковый номер опороса свиноматки достоверно не влиял ни на один из исследованных нами показателей, в этой таблице объединены данные по всем опоросам: с 1-го по 9-й опорос. Оказалось, что ОНП полиморфизм достоверно ассоциирован с числом живых поросят ($F(2,257) = 4,184$, $p = 0,016$) и массой гнезда ($F(2,242) = 5,960$, $p = 0,003$) при рождении. Оба этих показателя у гетерозиготных свиноматок CG оказались

Таблица 1

Частота генотипов и аллелей ОНП в гене *PANE1* у домашних и диких свиней

Форма <i>Sus scrofa</i>	Число особей	Частота генотипов, %			Частота аллелей, %		χ^2 *
		CC	CG	GG	C	G	
Крупная белая порода	72	0,625	0,347	0,028	0,800	0,200	0,455
Порода ландрас	45	0,778	0,200	0,022	0,878	0,122	0,207
Дикий кабан	34	0,795	0,176	0,029	0,862	0,118	0,765

* Проверка отклонения распределения генотипов от равновесия Харди–Вайнберга.

Таблица 2

Анализ ассоциации ОНП в гене *PANE1* у свиней крупной белой породы с числом и массой новорожденных поросят

Признак	Генотипы			P^*
	CC	CG	GG	
Число живых поросят в помете, шт.	10,57 ± 0,17 ^a (160)	9,73 ± 0,24 ^b (83)	10,73 ± 0,66 ^{ab} (11)	0,016
Масса гнезда поросят, кг	12,68 ± 0,24 ^a (154)	11,29 ± 0,33 ^b (80)	12,65 ± 0,89 ^{ab} (11)	0,003
Средняя масса одного поросенка, кг	1,20 ± 0,02 ^a (154)	1,17 ± 0,02 ^a (80)	1,19 ± 0,06 ^a (11)	0,541

* По результатам однофакторного дисперсионного анализа. Данные представлены как среднее ± среднее квадратическое отклонение (число наблюдений). Одинаковые буквы в надстрочных индексах показывают отсутствие достоверных различий средних величин для разных генотипов по результатам post-hoc теста Фишера.

достоверно ниже, чем у гомозиготных свиноматок СС. Число живых поросят и масса гнезда при рождении у гомозиготных свиноматок GG существенно не отличались от этих же показателей у свиноматок с генотипами СС и CG. Однако наше исследование не позволяет сделать однозначный вывод о влиянии редкого генотипа GG на репродуктивные показатели свиноматок, поскольку эта группа состояла лишь из двух свиноматок, которые имели 4 и 7 опоросов. Генотип матери по ОНП в гене *PANE1* не оказывал влияния на среднюю массу одного поросенка при рождении ($F(2,242) = 0,617, p = 0,541$).

Ранее у поросят породы ландрас была показана ассоциация ОНП гена *PANE1* с процентным соотношением лимфоцитов, общими количеством лимфоцитов и массой при рождении (Huang *et al.*, 2010). Процентное соотношение лимфоцитов у поросят с генотипом СС было достоверно выше, чем у поросят с генотипами CG и GG в порядке $CC > CG > GG$, при этом масса у новорожденных поросят с генотипом СС была достоверно ниже, чем у поросят с генотипами CG и GG в порядке $CC < CG < GG$. Эти факты хорошо согласуются с гипотезой о влиянии полиморфизма гена *PANE1* на компромиссное распределение ресурсов между иммунной системой и репродуктивной функцией у свиней. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что полиморфизм гена *PANE1* также влияет на репродуктивные показатели у взрослых животных (свиноматок). Можно предполагать, что взрослые свиноматки с различными генотипами по ОНП гена *PANE1* будут также иметь различные показатели иммунитета в период беременности, однако этот вопрос требует дальнейшего изучения.

Таким образом, нами впервые показано, что носительство генотипа CG ОНП полиморфизма гена *PANE1* у свиноматок крупной белой породы приводит к снижению числа живых поросят в помете и массы гнезда при рождении.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (научный проект № 13-04-00968-а), СО РАН (экспедиционный проект № 3э), Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные

науки – медицине» (проект № ФНМ-2012-05) и базового бюджетного проекта VI.53.1.2.

ЛИТЕРАТУРА

- Мошкин М.П., Герлинская Л.А., Евсиков В.И. Иммунная система и реализация поведенческих стратегий размножения при паразитарных прессах // Журн. общ. биологии. 2003. Т. 64. № 1. С. 23–44.
- Beecher C., Daly M., Childs S. *et al.* Polymorphisms in bovine immune genes and their associations with somatic cell count and milk production in dairy cattle // BMC Genet. 2010. V. 11. P. 99.
- Bierie B., Edwin M., Melenhorst J.J., Hennighausen L. The proliferation associated nuclear element (PANE1) is conserved between mammals and fish and preferentially expressed in activated lymphoid cells // Gene Expr. Patterns. 2004. V. 4. No. 4. P. 389–395.
- Brickner A.G., Evans A.M., Mito J.K. *et al.* The PANE1 gene encodes a novel human minor histocompatibility antigen that is selectively expressed in B-lymphoid cells and B-CLL // Blood. 2006. V. 107. No. 9. P. 3779–3786.
- Folstad I., Karter A.J. Parasites, bright males, and the immunocompetence handicap // Amer. Nat. 1992. V. 139. No. 3. P. 603–622.
- Hamilton W.D., Zuk M. Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? // Science. 1982. V. 218. No. 4570. P. 384–387.
- Huang H., Deng H., Yang Y. *et al.* Molecular characterization and association analysis of porcine PANE1 gene // Mol. Biol. Rep. 2010. V. 37. No. 5. P. 2571–2577.
- Leyva-Baca I., Schenkel F., Sharma B.S. *et al.* Identification of single nucleotide polymorphisms in the bovine CCL2, IL8, CCR2 and IL8RA genes and their association with health and production in Canadian Holsteins // Anim. Genet. 2007. V. 38. No. 3. P. 198–202.
- Pant S.D., Schenkel F.S., Leyva-Baca I. *et al.* Identification of single nucleotide polymorphisms in bovine CARD15 and their associations with health and production traits in Canadian Holsteins // BMC Genomics. 2007. V. 8. P. 421.
- Renou J.P., Bierie B., Miyoshi K. *et al.* Identification of genes differentially expressed in mouse mammary epithelium transformed by an activated beta-catenin // Oncogene. 2003. V. 22. No. 29. P. 4594–4610.
- Tetzlaff S., Jonas E., Phatsara C. *et al.* Evidence for association of lymphoid enhancer-binding factor-1 (LEF1) with the number of functional and inverted teats in pigs // Cytogenet. Genome Res. 2009. V. 124. No. 2. P. 139–146.
- van der Most P.J., de Jong B., Parmentier H.K., Verhulst S. Trade-off between growth and immune function: a meta-analysis of selection experiments // Funct. Ecol. 2011. V. 25. No. 1. P. 74–80.
- Yudin N.S., Aitnazarov R.B., Voevoda M.I. *et al.* Association of polymorphism harbored by tumor necrosis factor alpha gene and sex of calf with lactation performance in cattle // Asian Austral. J. Anim. Sci. 2013. V. 26. No. 10. P. 1379–1387.

ROLE OF POLYMORPHISM FOR THE *PANE1* GENE IN THE FORMATION OF REPRODUCTIVE INDICES IN PIGS

N.S. Yudin¹, R.B. Aitnazarov¹, S.P. Knyazev², V.A. Bekenev³,
Yu.V. Podoba⁴, A.B. Berdibaeva⁵, M.I. Voevoda^{1,6}

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia;

² Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia,
e-mail: yudin@bionet.nsc.ru;

³ Siberian Research Institute for Animal Husbandry, Novosibirsk, Russia;

⁴ Institute of Cultivation and Genetics of Animals, Ukrainian Academy of Agrarian Sciences,
Chubinskoe, Borispol region, Kiev oblast, Ukraine;

⁵ Institute of Biotechnology, Kyrgyz Academy of Sciences, Bishkek, Kyrgyz Republic;

⁶ Research Institute of Internal Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy
of Medical Sciences, Novosibirsk, Russia

Summary

A tradeoff between reproductive success and immunity is observed in wild and laboratory animals owing to limited energy resources of an organism. Therefore, artificial selection of farm animals for reproductive indices may be accompanied by reduced immune response. Formerly, a single-nucleotide polymorphism in the *PANE1* gene for a minor histocompatibility antigen was demonstrated to be positively associated with immunological blood indices and negatively associated with birthweight in Landrace pigs (Huang *et al.*, 2010). In the present study, the frequency of the SNP was determined in domestic pigs and wild boars, and its association with reproductive indices in pigs of the Large White breed. Wild boars, domestic Landrace pigs, and Large White pigs did not differ significantly in the frequency of the rare *G* allele of *PANE1*: 11,8, 12,2, and 20,0 %, respectively. Carriership of the CG genotype in females reduced the live litter size and weight.

Key words: pig, Large White breed, wild hog, *Sus scrofa*, *PANE1* gene, single-nucleotide polymorphism, association, reproductive trait, immunity.