

## РЕДКОЕ СОЧЕТАНИЕ ДВУХ НОВЫХ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ В ИНТРОНЕ 16 ГЕНА РЕЦЕПТОРА РИАНОДИНА *RYR1* У СВИНЕЙ КЕМЕРОВСКОЙ ПОРОДЫ

Н.С. Юдин<sup>1</sup>, С.П. Князев<sup>2</sup>, Р.Б. Айтназаров<sup>1</sup>, И.В. Куликов<sup>3</sup>, В.Ф. Кобзев<sup>1</sup>,  
Е.В. Игнатъева<sup>1</sup>, С.В. Никитин<sup>1</sup>, В.И. Ермолаев<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: yudin@bionet.nsc.ru;

<sup>2</sup> Новосибирский государственный аграрный университет,  
кафедра разведения и кормления животных, Новосибирск, Россия;

<sup>3</sup> Государственное учреждение НИИ терапии Сибирского отделения РАМН,  
Новосибирск, Россия

Замена 1843С>Т в экзоне 17 гена рецептора рианоидина *RYR1* в гомозиготном состоянии вызывает у свиней синдром индуцируемой стрессом или галотаном злокачественной гипертермии, который приводит к значительным экономическим потерям в свиноводстве. У свиней кемеровской породы злокачественная гипертермия встречается с частотой более 40 %, при этом у них выявлена низкая частота мутации 1843С>Т.

Целью работы был поиск новых мутаций в экзоне 17 и фланкирующих его участках интронов гена *RYR1* у свиней кемеровской породы. У всех изученных животных мутация 1843С>Т отсутствовала. В интроне 16 обнаружены два новых однонуклеотидных полиморфизма (ОНП), 18359Т>С и 18361А>G, с частотой редкого аллеля 0,225 и 0,083 соответственно. Замена 18359Т>С может быть причиной злокачественной гипертермии, поскольку приводит к нарушению потенциального сайта связывания транскрипционного фактора СТСФ, а также может находиться в неравновесии по сцеплению с еще неизвестной мутацией, являющейся причиной формирования патологического фенотипа. Сочетание двух ОНП, разделенных одним нуклеотидом, в интроне гена, выявленных с разной частотой у представителей одной популяции, даже в хорошо изученном геноме человека, встречается очень редко.

**Ключевые слова:** свинья, злокачественная гипертермия, ген *RYR1*, однонуклеотидный полиморфизм.

### Введение

В 1991 г. была описана нуклеотидная замена цитидина на тимидин в экзоне 17 гена *RYR1* рецептора рианоидина, который кодирует экспрессирующийся в скелетных мышцах белок кальциевого канала (Fujii *et al.*, 1991). Эта замена в 1843-й позиции кДНК (1843С>Т) приводит к замене аргинина на цистеин в позиции 615 полипептида (R615C) и в гомозиготном состоянии вызывает у свиней синдром индуцируемой стрессом или галотаном злокачественной гипертермии (Malignant Hyperthermia Syndrome, MHS), также называемый свиным стресс-синдромом (Porcine Stress Syndrome, PSS)

(Ogawa *et al.*, 2004). Поскольку эта мутация также ассоциирована с высоким содержанием более постного мяса в туше, интенсивная селекция в последние десятилетия заметно повысила частоту этой мутации в популяциях свиней (Andersson, Georges, 2004). В результате животные с высоким содержанием мяса часто характеризуются низкой устойчивостью к стрессу, следствием чего является ухудшение качества свинины, замедление роста у поросят, снижение репродуктивных показателей и иммунного статуса (Князев и др., 1998).

Широко применявшийся в мясном свиноводстве до последнего времени галотановый тест не позволял выявить гетерозиготных

носителей мутации. После внедрения метода ДНК-диагностики идентификация таких животных стала возможной и получила широкое распространение в селекционных программах свиноводства по уменьшению генетического груза свиного стресс-синдрома (Ibeagha-Awemu *et al.*, 2008).

Однако несмотря на высокую общую корреляцию оценок частоты рецессивного аллеля по результатам галотанового теста и генотипирования ДНК, в некоторых породах они не совпадают. У свиней кемеровской породы, в которой не проводили направленную селекцию против галотан-чувствительности, более 15 лет назад С.П. Князевым и др. (1998) была обнаружена высокая частота MHS и крайне низкая частота мутации 1843C>T. Это позволило авторам высказать предположение о существовании у этих животных неизвестной мутации другого нуклеотида гена *RYR1*. В отличие от свиньи, для которой известна лишь одна патологическая мутация, у человека выявлено 178 мутаций гена *RYR1*, ассоциированных с MHS и другими наследственными миопатиями (Robinson *et al.*, 2006). «Горячие точки» мутаций у человека сосредоточены в трех областях – с 2 по 17, с 39 по 46 и с 85 по 103 экзона.

Целью работы был поиск новых мутаций в экзоне 17 и фланкирующих его участках интронов гена *RYR1* у свиней кемеровской породы.

### Материалы и методы

Материалом для исследования послужили образцы крови 60 свиней кемеровской породы (госплемзавод «Юргинский», Кемеровская область). Геномную ДНК выделяли стандартным методом протеолитической обработки с последующей экстракцией фенол-хлороформом. Амплификацию фрагмента гена *RYR1* проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 75 мМ ТрисHCl (pH 9,0), 20 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01 %-й твин, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, по 200 мкМ каждого dNTP, по 1 мкМ каждого праймера, 2,5 ед. активности *Taq*-полимеразы («Сибэнзим», Новосибирск) и 0,5–1 мкг ДНК в течение 34 циклов (94 °C – 1 мин, 64 °C – 1 мин, 72 °C – 1 мин) с предварительной денатурацией при 94 °C – 3 мин. В работе использовали праймеры

5'-TCCAGTTTGCCACAGGTCCTACCA-3' (прямой) и 5'-ATTACCGGAGTGGAGTCTCTGAG-3' (обратный). Праймеры фланкировали фрагмент размером 660 п.н., включавший часть интрона 16 (445 п.н.), весь экзон 17 (134 п.н.) и часть интрона 17 (81 п.н.) гена *RYR1*.

Специфичность продукта ПЦР оценивали методом гель-электрофореза в 4 %-м полиакриламидном геле с окраской бромистым этидием и последующей визуальной идентификацией в ультрафиолете. Секвенирование ДНК проводили на праймерах, использованных для амплификации, с применением набора ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя. Продукты реакции анализировали на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Нуклеотидную последовательность в гене *RYR1* нумеровали согласно последовательности GenBank Z49778. Распознавание сайтов связывания транскрипционных факторов проводили с помощью программы TESS (Schug, 2008). Оценку частоты сочетаний ОНП проводили с использованием данных проекта Нармар, доступ к которым осуществляли через геномный браузер UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>) (версия генома человека на март 2006 г.) и базу данных dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>).

### Результаты

У всех 60 изученных животных отсутствовала как мутация 1843C>T, так и описанные ранее ОНП в экзоне 17 в позициях 1878 (Fujii *et al.*, 1991) и 1851 (Beja-Pereira *et al.*, 2001) на кДНК. Обнаружены два ранее неизвестных ОНП в интроне 16 гена *RYR1* – 18359T>C и 18361A>G (рис. 1). Частота редкого мутантного аллеля для ОНП 18359T>C и 18361A>G составляла 0,225 и 0,083 соответственно (табл. 1). Наблюдаемое распределение генотипов соответствует равновесию Харди–Вайнберга как для ОНП 18359T>C ( $\chi^2 = 0,001$ ,  $df = 2$ ), так и для ОНП 18361A>G ( $\chi^2 = 0,496$ ,  $df = 2$ ).

Мутации в двух соседних нуклеотидах, безусловно, – редкое событие. Поэтому мы оценили как часто такие сочетания ОНП встречаются в геноме наиболее изученного в плане генети-

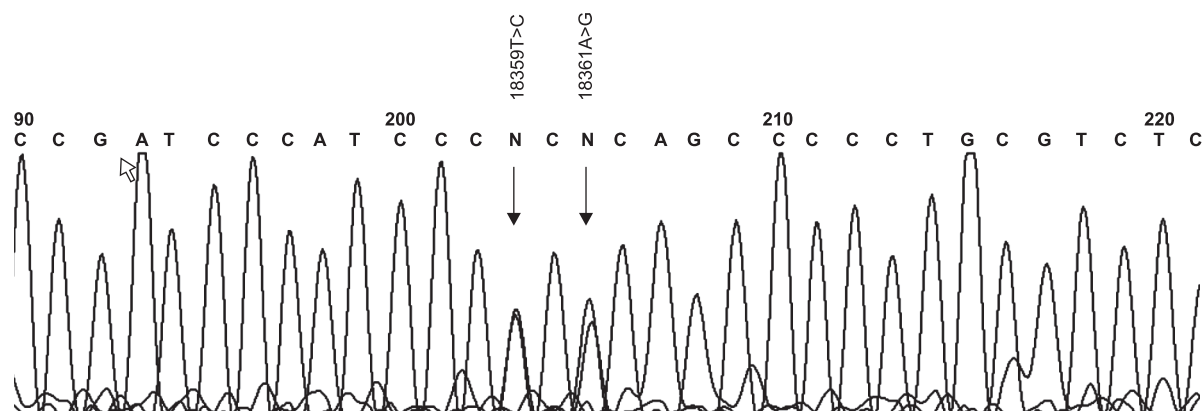


Рис. 1. Типичная секвеннограмма фрагмента интрона 16 гена *RYR1*.

Стрелками обозначены позиции новых ОНП.

Таблица 1

Частота генотипов и аллелей двух новых ОНП в интроне 16 гена *RYR1* у свиней кемеровской породы

ОНП	Генотипы, %			Аллели, %	
	NN	Nn	nn	N	n
18359T>C	36 (0,600)	21 (0,35)	3 (0,050)	93 (0,775)	27 (0,225)
18361A>G	50 (0,833)	10 (0,167)	0 (0,000)	110 (0,917)	10 (0,083)

Примечание. N и n – распространенный и редкий аллель ОНП соответственно.

ческого разнообразия вида эукариот – человека (табл. 2). Оказалось, что среди 58128 ОНП, генотипированных на 22-й хромосоме человека в четырех популяциях в рамках программы Нармар, аналогичное сочетание (два ОНП в интроне гена, разделенные одним нуклеотидом, различающиеся по частоте в одной и той же популяции) встречается лишь в 15 случаях (0,03 %). По-видимому, подобное сочетание ОНП в геноме свиньи также является очень редким событием.

Известно, что интроны генов могут содержать сайты связывания белков транскрипционных факторов, взаимодействие которых с ДНК усиливает либо ослабляет транскрипционную активность генов. Для того, чтобы оценить потенциальный эффект обнаруженных ОНП, нами проведено распознавание потенциальных сайтов связывания транскрипционных факторов на участке ДНК, включающем оба ОНП. Обнаружено, что замена тимидина на цитидин в позиции 18359 приводит к нарушению потенциального сайта связывания транскрипционного

фактора CTCF (нормальная последовательность CCCTC, мутантная – CCCCC, консенсус CCCTC), который экспрессируется в мышечной ткани (Ohlsson *et al.*, 2009).

### Обсуждение

Полученные результаты хорошо согласуются с полученными 15 лет назад С.П. Князевым с соавт. (1998) оценками частоты мутации в позиции кДНК 1843C>T у свиней юргинской популяции кемеровской породы. В 1995 г. авторы не обнаружили у 66 основных хряков-производителей аллель T, а частота этого аллеля среди поросят с 1993 по 1995 гг. снизилась в 3 раза: с 4,1 до 1,3 %. ОНП в позициях 1851 и 1878 кДНК были описаны лишь в двух публикациях у свиней пород алентеджано (Beja-Pereira *et al.*, 2001) и пьетрен (Fujii *et al.*, 1991) в Западной Европе. Кемеровская порода филогенетически никак не связана с этими породами и выведена в результате скрещивания местных сибирских скороспелых свиней с завезенными из европей-

Таблица 2

Сочетания двух ОНП в интроне гена, разделенных одним нуклеотидом, различающихся по частоте в одной и той же популяции проекта Хармар на 22-й хромосоме человека

№	Ген	1-й ОНП		2-й ОНП		Популяция
		Идентификатор	Позиция	Идентификатор	Позиция	
1	<i>BCR</i>	rs5759673	23617555	rs3788359	23617557	Африка
2	<i>CRYBB1</i>	rs5761627	27004298	rs2071859	27004300	Европа, Африка, Китай, Япония
3	<i>EMID1</i>	rs2239833	29620562	rs132389	29620564	Африка
4	<i>EMID1</i>	rs738435	29641739	rs5763094	29641741	Африка
5	<i>LARGE</i>	rs9609772	33768875	rs9621687	33768877	Европа, Китай, Япония
6	<i>LARGE</i>	rs16992583	33980719	rs9609828	33980721	Европа
7	<i>LARGE</i>	rs2253085	34245401	rs5999121	34245403	Африка
8	<i>CSF2RB</i>	rs1534879	37328966	rs4339047	37328968	Африка, Китай, Япония
9	<i>EP300</i>	rs3818120	41523770	rs3818121	41523772	Китай, Япония
10	<i>CYB5R3</i>	rs8190443	43024499	rs8190442	43024501	Африка
11	<i>PARVB</i>	rs6006491	44522310	rs1535009	44522312	Африка
12	<i>NUP50</i>	rs2673086	45579731	rs2075953	45579733	Китай
13	<i>ATXN10</i>	rs6007152	46144505	rs17573516	46144507	Европа, Африка
14	<i>ATXN10</i>	rs5765613	46162998	rs9626441	46163000	Китай, Япония
15	<i>PPARA</i>	rs4253711	46595033	rs4253712	46595035	Европа, Африка, Китай, Япония

ской части бывшего СССР хряками крупной белой, беркширской, крупной черной и других пород (Гудилин и др., 2003). Низкая частота и отсутствие гомозигот по редкому аллелю ОНП 18361A>G свидетельствуют о его более молодом эволюционном возрасте. Наблюдаемое разнообразие генотипов соответствует существованию трех гаплотипов: ТА, СА и СГ. Отсюда можно предположить, что наблюдаемое сочетание ОНП возникло в результате двух независимых мутаций и маркирует «горячую точку» мутационного процесса.

ОНП 18359Т>С потенциально может воздействовать на уровень экспрессии мРНК гена *RYR1*, вызывая нарушение потенциального сайта связывания транскрипционного фактора CTCF, что может повлиять на проявление синдрома MHS у свиней. При 5-балльной оценке силы реагирования поросят в галотановом тесте (от 1 балла при полном расслаблении скелетной мускулатуры до 5 баллов при очень сильном ее напряжении) многие критерии свидетельствуют о том, что только реакции в 3–5 баллов можно отождествлять с галотан-положительной

реакцией, а в 1–2 балла – с галотан-отрицательной (Князев и др., 1998). Кемеровская порода свиней характеризуется широким спектром выраженности реакции у отдельных животных. При высокой общей доле галотан-чувствительных свиней (40,6 %) процент особей с сильной (3–5 баллов) реакцией составляет лишь 7,6 % (Князев и др., 1998). Не исключено, что разная степень реакции свиней на галотан связана с разными генотипами животных по ОНП 18359Т>С. Некоторые уже известные мутации, по-видимому, также могут вызывать злокачественную гипертермию у человека посредством нарушения уровня транскрипции мРНК гена *RYR1* (Robinson *et al.*, 2006).

Возможно также, что ОНП 18359Т>С находится в неравновесии по сцеплению с еще неизвестной мутацией, являющейся причиной формирования патологического фенотипа у свиней кемеровской породы. В пользу этой гипотезы говорит высокая частота этого полиморфизма. Хотя частота особей с сильной галотан-чувствительностью (7,6 %) (Князев и др., 1998) несколько превышает ожидаемую



по закону Харди–Вайнберга частоту гомозигот С/С по нашим данным (5,1 %), эти различия объясняются промежутком времени в 15 лет, прошедшим с первого исследования. Показано, что в ходе селекции на общую крепость животных у кемеровской породы со временем снижается доля свиней с высокой экспрессивностью галотан-чувствительности (Князев и др., 1998). Для поиска истинной «причинной» мутации необходимо ресеквенировать другие районы гена *RYR1*. Наши данные также не отвергают гипотезу (Князев и др., 1998), что причиной MHS-PSS у свиней в некоторых случаях могут быть мутации в других генах.

У свиньи известно 19 ОНП в локусе *RYR1* (Fujii *et al.*, 1991; Beja-Pereira *et al.*, 2001). Полученные нами данные дополняют этот список двумя новыми впервые выявленными ОНП и могут быть использованы при генетическом анализе хозяйственно важных признаков у свиней. Следует отметить, что в плане ОНП маркеров свинья остается крайне малоизученным объектом. В базе данных dbSNP на январь 2010 г. имеется информация всего лишь о 8512 ОНП в геноме свиньи *Sus scrofa*, в то время как для крупного рогатого скота *Bos taurus* их число составляет 2210641, для человека *Homo sapiens* (при сопоставимом размере генома) – 25003333. В 2009 г. компания Illumina (США) выпустила в продажу биочип PorcineSNP60 для генотипирования более 60 тыс. ОНП свиньи, однако подробная информация по ним пока не внесена в общедоступные базы данных (Ramos *et al.*, 2009).

Таким образом, у свиней кемеровской породы отсутствует полиморфизм ДНК в экзоне 17 гена *RYR1*. Поиск новых мутаций выявил два ранее неизвестных ОНП в интроне 16: 18359Т>С и 18361А>G. Полиморфизм 18359Т>С потенциально может влиять на уровень экспрессии мРНК гена *RYR1*, а также находится в неравновесии по сцеплению с неизвестной мутацией, являющейся причиной злокачественной гипертермии/свиного стресс-синдрома.

Сочетание двух ОНП, разделенных одним нуклеотидом, в интроне гена, с сильно различающейся частотой в одной и той же популяции даже в хорошо изученном геноме человека встречается очень редко, а для домашней свиньи такое явление, обнаруженное в настоящей работе, представляется уникальным.

Исследование поддержано грантом подпрограммы «Динамика генофондов» программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Биоразнообразие и динамика генофондов» и проектом № 29 программы РАН «Биологическое разнообразие».

## Литература

- Гудилин И.И., Дементьев В.Н., Тараканов Е.А. и др. Кемеровская порода свиней. Новосибирск: Редакционно-полиграфическое объединение СО РАСХН, 2003. 388 с.
- Князев С.П., Жучаев К.В., Гарт В.В., Хардге Т. Проблемы дискордантности и косегрегации экспрессии галотан-чувствительности свиней с мутацией 1843 С-Т в локусе *RYR1* рецептора рианодина // Генетика. 1998. Т. 34. № 12. С. 1648–1654.
- Andersson L., Georges M. Domestic-animal genomics: deciphering the genetics of complex traits // Nat. Rev. Genet. 2004. V. 5. P. 202–212.
- Beja-Pereira A., Bento P., Ferrand N., Brenig B. Genetic polymorphism of the 17th Exon at the Porcine *RYR1* locus: a new variant in a local Portuguese pig breed demonstrated by SSCP analysis // J. Anim. Breed. Genet. 2001. V. 118. P. 271–274.
- Fujii J., Otsu K., Zorzato F. *et al.* Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia // Science. 1991. V. 253. P. 448–451.
- Ibeagha-Awemu E.M., Kgwatalala P., Ibeagha A.E., Zhao X. A critical analysis of disease-associated DNA polymorphisms in the genes of cattle, goat, sheep, and pig // Mamm. Genome. 2008. V. 19. P. 226–245.
- Ogawa Y. Dysregulation of the gain of CICR through ryanodine receptor1 (RyR1): the putative mechanism underlying malignant hyperthermia // Adv. Exptl. Med. Biol. 2007. V. 592. P. 287–294.
- Ohlsson R., Lobanenko V., Klenova E. Does CTCF mediate between nuclear organization and gene expression? // BioEssays. 2009. V. 32. P. 37–50.
- Ramos A.M., Crooijmans R.P., Affara N.A. *et al.* Design of a high density SNP genotyping assay in the pig using SNPs identified and characterized by next generation sequencing technology // PLoS One. 2009. V. 4. P. e6524.
- Robinson R., Carpenter D., Shaw M.A. *et al.* Mutations in *RYR1* in malignant hyperthermia and central core disease // Hum. Mutat. 2006. V. 10. P. 977–989.
- Schug J. Using TESS to predict transcription factor binding sites in DNA sequence // Curr. Protoc. Bioinformatics. 2008. Chapter 2:Unit 2.6.

**A RARE COMBINATION OF TWO NEW SINGLE NUCLEOTIDE  
POLYMORPHISMS IN INTRON 16 OF THE *RYR1* GENE  
IN THE KEMEROVO PIG BREED**

**N.S. Yudin<sup>1</sup>, S.P. Knyazev<sup>2</sup>, R.B. Aitnazarov<sup>1</sup>, I.V. Kulikov<sup>3</sup>, V.F. Kobzev<sup>1</sup>, E.V. Ignatieva<sup>1</sup>,  
S.V. Nikitin<sup>1</sup>, V.I. Ermolaev<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: yudin@bionet.nsc.ru;

<sup>2</sup> Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia;

<sup>3</sup> Institute of Internal Medicine, SB RAMS, Novosibirsk, Russia

**Summary**

The homozygous state for the 1843C>T substitution in exon 17 of the ryanodine receptor gene *RYR1* causes the stress- or halothane-induced malignant hyperthermia syndrome in pigs, which leads to notable economic losses in pork production. Malignant hyperthermia was found among pigs of Kemerovskaya breed at a frequency more than 40 %, while they had a low frequency of 1843C>T mutation. The aim of this study was to scan the 17th exon and flanking regions of introns of the *RYR1* gene in Kemerovskaya breed pigs for unknown mutations. The 1843C>T mutation was absent from all animals under study. Two new single nucleotide polymorphisms (SNPs), 18359T>C and 18361A>G, were identified in the 16th intron with minor allele frequencies: 0,225 and 0,083, respectively. The 18359T>C substitution can cause malignant hyperthermia by abolishing the potential binding site of the CTCF transcription factor. It also can be in linkage disequilibrium with an unknown mutation causative of the pathological phenotype. A combination of two SNPs, separated by one nucleotide, in an intron of a gene, which occur in representatives of one population at different frequencies, is a very rare phenomenon even in the well-studied human genome.

**Key words:** pig, malignant hyperthermia, *RYR1* gene, single nucleotide polymorphism.