

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2025-2-2576>
<https://elibrary.ru/YYWDWB>

Оригинальная статья
<https://fptt.ru>

Полиморфизм 8 и 13 экзонов меланофилина кролика у родительских пород и межпородного кросса Родник



Г. Ю. Косовский^{ID}, А. Р. Шумилина^{ID}, О. И. Абрамов,
Д. В. Попов^{ID}, Т. Т. Глазко^{ID}, О. И. Скобель*^{ID}, А. В. Леонов^{ID}

Научно-исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства имени В. А. Афанасьева^{ROR},
пос. Родники, Россия

Поступила в редакцию: 19.03.2025
Принята после рецензирования: 21.04.2025
Принята к публикации: 06.05.2025

*О. И. Скобель: skobelolga@gmail.com,
<https://orcid.org/0000-0002-0599-9787>
Г. Ю. Косовский: <https://orcid.org/0000-0003-3808-3086>
А. Р. Шумилина: <https://orcid.org/0000-0003-1961-8428>
Д. В. Попов: <https://orcid.org/0000-0001-7422-5470>
Т. Т. Глазко: <https://orcid.org/0000-0002-3879-6935>
А. В. Леонов: <https://orcid.org/0000-0001-5486-3264>

© Г. Ю. Косовский, А. Р. Шумилина, О. И. Абрамов, Д. В. Попов,
Т. Т. Глазко, О. И. Скобель, А. В. Леонов, 2025



Аннотация.

Создание новых форм животных сельскохозяйственных видов на основе многопородных скрещиваний требует развития методов популяционно-генетического контроля селекционного процесса. На основании многостадийных поколений скрещиваний кроликов пород белый великан, советская шиншилла, калифорнийская с последующим разведением «в себе» в Научно-исследовательском институте пушного звероводства и кролиководства имени В. А. Афанасьева создан скороспелый и высокопродуктивный кросс кроликов Родник. Проведенные ранее исследования показали, что по ряду полилокусных генотипов высоко полиморфных элементов кролики кросса Родник ближе к породе белый великан, чем к двум другим родительским породам. Цель исследования – выяснить изменения популяционно-генетической структуры трехпородного кросса через сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей 8 и 13 экзонов гена меланофилина (*mlph*), одного из ключевых генов окраса у млекопитающих, у кросса Родник и родительских пород.

Объекты исследования – породы кроликов белый великан, советская шиншилла, калифорнийская и кросс Родник. Анализ структуры гена *mlph* у *Oryctolagus cuniculus* выполнен биоинформатическими методами с использованием нуклеотидной последовательности референсного генома UM_NZW_1.0 (GCF_009806435.1) из базы данных GenBank. Экзон-интронную структуру определяли в программе Splign, а условия и стадии ПЦР, включая дизайн праймеров для экзонных областей, разрабатывались с помощью онлайн версии программы BLAST3. Для выявления отличий между кроликами окраса шиншилла и другими породами выбраны экзоны 8 и 13.

По некоторым характеристикам окраса кросс Родник из трех родительских пород оказался ближе к калифорнийской. Исследование выявило мононуклеотидный полиморфизм (SNP) в экзоне 8 в двух нуклеотидах и в экзоне 13 в одном нуклеотиде. Гаплотипы двух SNP в экзоне 8 и одного в экзоне 13 гена *mlph* кросса совпадали с породой белый великан и присутствовали в гомозиготном варианте. Породы советская шиншилла и калифорнийская несли гетерозиготный гаплотип по двум SNP в экзоне 8 и в гомозиготе другого нуклеотида (С–Т) в экзоне 13 в тех же позициях. Выявленные SNP не коррелировали с окрасом, но по генотипам, как и по полиморфизмам ряда высоко полиморфных геномных элементов, кросс Родник оказался ближе к породе белый великан, чем к другим родительским породам.

Обсуждается возможное вовлечение гена *mlph* в селекционный процесс в связи с его принадлежностью к суперсемейству онкогена Ras, к крупнейшему экзофилиновому подсемейству Rab-эффекторных белков, координирующих везикулярный транспорт, а также некоторые этапы адипогенеза.

Ключевые слова. Кролик, селекция, популяционно-генетическая структура, меланофинин (*mlph*), SNP, окрас, внутриклеточные органеллы, кросс

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России по теме НИР «Разработка научных основ сокращения времени и увеличения надежности селекционной работы по получению новых форм животных с применением генных и геномных технологий» (FGGR-2024-0001).

Для цитирования: Косовский Г. Ю., Шумилина А. Р., Абрамов О. И., Попов Д. В., Глазко Т. Т. и др. Полиморфизм 8 и 13 экзонов меланофилина кролика у родительских пород и межпородного кросса Родник. Техника и технология пищевых производств. 2025. Т. 55. № 2. С. 331–340. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2025-2-2576>

Melanophilin Polymorphism of Exons 8 and 13 in Rabbits: Parent Breeds and Interbreed Cross Rodnik



Gleb Yu. Kosovsky^{ORCID}, Anna R. Shumilina^{ORCID},
Oleg I. Abramov, Dmitry V. Popov^{ORCID}, Tatiana T. Glazko^{ORCID},
Olga I. Skobel*^{ORCID}, Artem V. Leonov^{ORCID}

Research Institute for Fur Farming and Rabbit Breeding^{ORCID}, Rodniki, Russia

Received: 19.03.2025
Revised: 21.04.2025
Accepted: 06.05.2025

*Olga I. Skobel: skobelolga@gmail.com,
<https://orcid.org/0000-0002-0599-9787>
Gleb Yu. Kosovsky: <https://orcid.org/0000-0003-3808-3086>
Anna R. Shumilina: <https://orcid.org/0000-0003-1961-8428>
Dmitry V. Popov: <https://orcid.org/0000-0001-7422-5470>
Tatiana T. Glazko: <https://orcid.org/0000-0002-3879-6935>
Artem V. Leonov: <https://orcid.org/0000-0001-5486-3264>

© G.Yu. Kosovsky, A.R. Shumilina, O.I. Abramov, D.V. Popov,
T.T. Glazko, O.I. Skobel, A.V. Leonov, 2025



Abstract.

New breeds of fur-bearing animals are multi-breed crosses. Selection requires new methods for genetic control. This article describes a new early-maturing and highly-productive crossbreed of rabbits called Rodnik obtained at the Afanasyev Research Institute for Fur Farming and Rabbit Breeding, Russia. It was a result of multi-stage generations of crossings between such breeds as White Giant, Soviet Chinchilla, and Californian. However, in terms of polylocus genotypes of highly polymorphic elements, the Rodnik rabbits are closer to the White Giant breed. The article describes the changes in the genetic pool of this three-breed cross through a comparative analysis of the nucleotide sequences of exons 8 and 13 of the melanophilin (*mlph*) color gene.

The research featured the rabbit breeds of White Giant, Soviet Chinchilla, and Californian, as well as their Rodnik cross. The analysis of the *mlph* gene in *Oryctolagus cuniculus* involved bioinformatics methods based on the nucleotide sequence of the reference genome UM_NZW_1.0 (GCF_009806435.1) from the GenBank database. The exon-intron structure was determined using the Splign software; the conditions and stages of PCR, including the design of primers for exonic regions, were developed using the online version of BLAST3. Exons 8 and 13 made it possible to identify the differences between chinchilla-colored rabbits and other breeds.

In some color properties, the Rodnik cross was closer to the Californian parent breed. A single nucleotide polymorphism (SNP) was detected in two nucleotides in exon 8 and in one nucleotide in exon 13. The haplotypes of two SNPs in exon 8 and one SNP in exon 13 of the *mlph* gene were homozygous and coincided with the White Giant breed. The Soviet Chinchilla and Californian breeds carried a heterozygous haplotype for two SNPs in exon 8, as well as in the homozygote of another nucleotide (C–T) in exon 13 in the same positions. The identified SNPs did not correlate with color. However, the Rodnik cross was closer to the White Giant in terms of genotypes and polymorphisms of some highly polymorphic genomic elements.

The *mlph* gene might become part of selection as it belongs to the Ras oncogene superfamily and the largest exophilin subfamily of Rab effector proteins that coordinate vesicular transport and some adipogenesis stages.

Keywords. Rabbits, breeding, population-genetic structure, melanophilin (*mlph*), SNP, fur color, intracellular organelles, crossbreed

Funding. The work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, State Assignment FGGR-2024-000: Scientific foundations for optimizing time and reliability of animal breeding using genetic and genomic technologies.

For citation: Kosovsky GYu, Shumilina AR, Abramov OI, Popov DV, Glazko TT, et al. Melanophilin Polymorphism of Exons 8 and 13 in Rabbits: Parent Breeds and Interbreed Cross Rodnik. Food Processing: Techniques and Technology. 2025;55(2):331–340. (In Russ.) <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2025-2-2576>

Введение

Европейский кролик (*Oryctolagus cuniculus*) – единственный представитель своего рода, обитающий на территории современной Европы и Северной Африки. Продовольственная и сельскохозяйственная организация Объединенных Наций описывает более 300 пород

кроликов, отличающихся по размеру, окрасу шерсти, длине ушей и типу меха. Домашний кролик считается одним из самых недавних одомашненных видов млекопитающих. Их domestикация началась примерно 1400–1500 лет назад в монастырях Франции после указа папы Григория I, в котором говорилось, что нерожденные

или новорожденные кролики не считаются мясом и, следовательно, их можно употреблять в пищу во время поста [1–3]. Домашнего кролика разводят в разных целях: он служит источником мяса, шерсти и меха. Кроме того, кролики являются адекватной и жизнеспособной моделью для экспериментальных исследований в различных отраслях биологии и биомедицины.

Окрас шерсти является основной характеристикой, используемой для определения породы кролика. Он также является важным показателем состояния кожи и меха, по которому оценивают экономическую ценность последнего. Описано более ста генов, влияющих на окраску меха, изученных на модельных объектах, – линейных лабораторных мышах. Исследуются пути формирования меланоцитов, меланосом, передача меланосом в кератиноциты (рис. 1) [4]. В базе данных генов окраски (*Color Genes database*) насчитывается 378 мышиных локусов с их влияющими на фенотипы пигментации гомологами у человека и рыб данио [5]. Выявлены ключевые гены окраса у млекопитающих, в том числе у домашнего кролика [6].

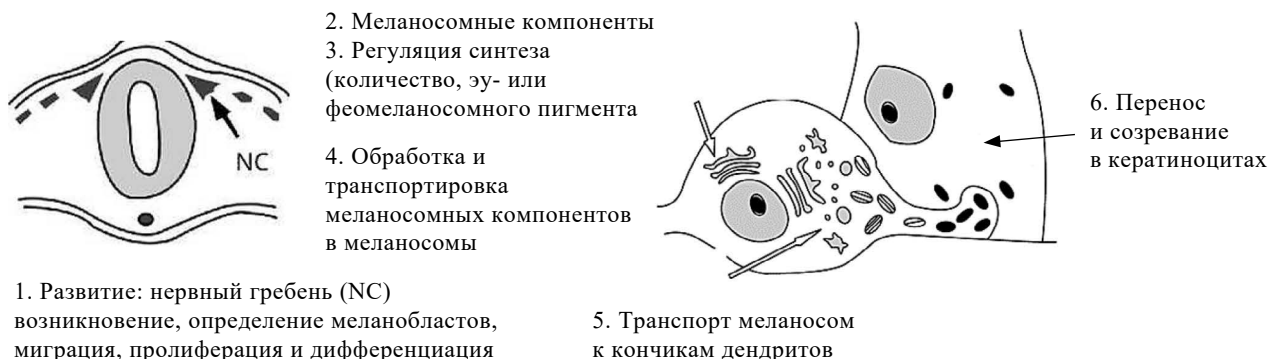
Меланоциты – специализированные клетки, которые содержат органеллы, связанные с лизосомами (меланосомы). Эти органеллы отвечают за синтез двух типов меланинов: эумеланинов (черные и коричневые пигменты) и феомеланинов (желтые и красные пигменты). Выявлены гены, участвующие в развитии, распределении, морфологии и структуре меланоцитов, а также гены, которые составляют или регулируют их ферментативный аппарат [8]. Одним из таких генов является меланофилин (*mlph*). Он принадлежит суперсемейству онкогена *Ras*, которое включает более 150 членов, и относится к крупнейшему подсемейству экзофилинов – *Rab*-эффекторных белков, координирующих везикулярный транспорт [9].

Меланофилин (*mlph*) включает три связывающих домена для других белков. На N-конце расположен связывающий домен для *Rab27* (*R27BD*), который относится к надсемейству малых *GTPase* семейства

Rab. *Rab27* связан с мембраной и может участвовать в транспорте белков и передаче сигналов, опосредованных малой *GTPase*. На C-конце расположены связывающие домены для миозина-Va (*MyoVa*) (*MBD*) и актина (*ABD*) [10, 11]. Белок, кодируемый *mlph*, участвует в переносе меланосом к концам дендритных ответвлений, из которых они путем эндоцитоза подхватываются кератиноцитами (рис. 1).

Нарушения работы *mlph* не позволяют эффективно транспортировать меланосомы к области плазматической мембраны дендритных выступов клеток меланоцитов, что приводит к накоплению меланосом в перинуклеарном пространстве [12]. Мутации *mlph* описаны у широкого спектра видов животных, а также у человека. Однако у разных видов и индивидуумов мишени мутантных нарушений, приводящих к ослаблению окраса, могут отличаться [13, 14]. У мышей выявлены фенотипы разбавления окраса, ассоциированные с мутациями в генах миозина, как, например, в *MYO5A* (миозин V). Данный белок относится к классу моторных белков на основе актина, участвующих в транспорте и закреплении цитоплазматических пузырьков, а также выравнивании полюсов веретена и транслокации мРНК. Мутации в этом гене приводят к фенотипу, для которого характерен «разбавленный» окрас. Другой белок – *Rab27a* (*GTPase Rab27a*), регулирующий ряд экзоцитарных процессов, связан с «пепельным» окрасом. Другие фенотипы относятся к изменениям в генах меланофилина, которые кодируют белки, составляющие транспортный комплекс меланосом [15]. *MLPH* – член подсемейства экзофилинов, или синаптоагмин-подобный белок *SLAC2*, один из эффекторных белков *Rab*. «Свинцовый» окрас относят к изменениям в этом белке [16–18].

S. Lehner et al. [19] установили, что у кролика разбавление окраса было связано с нарушением сплайсинга гена *mlph*, что сопровождалось выпадением из мРНК экзона 3 и 4, формированием укороченного белка и, соответственно, уменьшением скопления



Примечание: проиллюстрирован также перенос меланосом в кератиноциты и их процессинг в кератиноцитах, которые тоже находятся под генетическим контролем [7]

Рисунок 1. Основные процессы, на которые влияют гены, связанные с окрасом животных [4, 7]

Figure 1. Processes affected by fur color genes [4, 7]

меланосом. Секвенирование геномной ДНК выявило мутацию акцептора сплайсинга с.111-5C>A в полипиримидиновом тракте интрона 2 в *mlph*, что, предположительно, и вызывало пропуск экзонов 3 и 4.

В работе [20] определили, что мононуклеотидная делеция в экзоне 5 гена *mlph*, которая привела к сдвигу рамки считывания, может вызывать также разбавление окраса шерсти кроликов. Выполнено секвенирование в общей сложности 6357 пар нуклеотидов (п.н.), охватывающих некодирующие регионы (5'-фланкирующий регион, включая предполагаемый 5'-UTR, предполагаемый 3'-UTR и интронные последовательности, прилегающие к кодирующим экзонам), и все 15 экзонов, представленных в Ensembl (рис. 2), за исключением двух предполагаемых близких экзонов, экзонов 6 и 7 этой последовательности (учитывая порядок кодирующих регионов; позиции от 550665 до 550880 скаффолда GL018840), которые авторы не смогли амплифицировать.

Суммарно в секвенированных последовательностях выявлено 165 полиморфизмов: 137 – в некодирующих регионах, 28 – в кодирующих экзонах. Обнаружен трех аллельный комплекс индел (присутствие / отсутствие дубликации в 29 нуклеотидах с несколькими другими нуклеотидными различиями в первом интроне), не связанный с изменчивостью окраса кролика (рис. 2). Из 28 мононуклеотидных полиморфизмов (Single Nucleotide Polymorphisms – SNP) в экзонах, 15 были синонимичными заменами, а 12 SNP потенциально приводили к заменам аминокислот, кодируемых триплетами в экзоне 1 (p.Val18Ile), экзоне 2 (p.Gln71Arg или p.Gln71Trp и p.Thr87Ala), экзоне 3 (p.Gln146His), экзоне 5 (p.Trp204Arg), экзоне 8 (p.Gly307Ala и p.Val311Ala), экзоне 9 (p.Lys349Arg), экзоне 10 (p.Ser393Gly) и экзоне 12 (p.Asp481Ser). Единственным SNP, ассоциированным с ослаблением окраса у всех исследованных кроликов (198 кроли-

ков 23 разных пород), оказалась делеция в экзоне 5 (g.549853delG), которая вызывала сдвиг рамки считывания и приводила к появлению нового белка, кодируемого триплетами от начала экзона 5 до второй половины экзона 8, в которой появляется стоп-кодон и, как следствие, утрачивается домен С-конца белка MLPN [20]. Результаты исследования J. Demars *et al.* также подтвердили связь делеции g.549853delG с изменениями в окрасе домашнего кролика [21].

Выполнено сравнение SNP гена *mlph* у черного и окраса шиншилла у кроликов породы рекс [22], хорошо известной своей короткой, густой и гладкой шерстью. Этот фенотип породы рекс генетически произошел от носителей традиционной по структуре шерсти (три типа волос – остевые, направляющие и пуховые) [23]. В потомстве от скрещиваний кроликов этой породы наблюдается появление альбиносов [22]. Сравнение секвенированных последовательностей этой породы окрасов черный и шиншилла позволило выявить семь миссенс-мутаций SNP с формированием трех гаплотипов, по которым две группы с разными окрасами отличались друг от друга, в основном в экзоне 8 [22].

В Научно-исследовательском институте пушного звероводства и кролиководства имени В. А. Афанасьева путем сложного переменного скрещивания кроликов пород белый великан, советская шиншилла и калифорнийская был создан скороспелый и высокопродуктивный кросс кроликов Родник, обеспечивающий выход мяса до 1,5 кг при убое уже в 77-дневном возрасте. Полученный кросс имеет однородную окраску волосяного покрова: туловище и голова – белые; уши, нос, верх хвоста, лапы – серые; пух – чисто белый [24]. При этом окрас исходных пород значительно отличается. Советская шиншилла имеет общую серебристо-серо-голубую окраску и зональность остевых и пуховых волос, белый великан – чисто белый

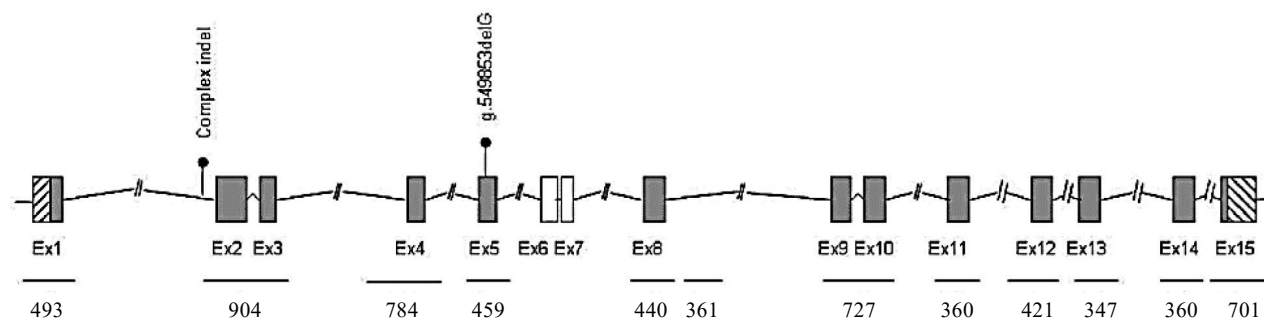


Рисунок 2. Схематическое изображение гена *mlph* кролика (как указано в последовательности гена *oryCun2.0* ENSOCUG00000016496) с секвенированными участками (обозначенными линиями под структурой гена) и положением генотипированных полиморфизмов. Белые квадратики указывают на два предполагаемых экзона, описанных в референсной последовательности ENSOCUG00000016496, которые не были подтверждены с помощью амплификации геномной ДНК и анализа BLASTN [20]

Figure 2. Rabbit *mlph* gene (*oryCun2.0* gene sequence ENSOCUG00000016496) with sequenced regions (underlined) and genotyped polymorphisms. Note: White squares indicate two putative exons described in the reference sequence ENSOCUG00000016496 that were not confirmed by genomic DNA amplification and BLASTN analysis [20]

цвет волосяного покрова, калифорнийская – белая окраска туловища и головы; черная – ушей, носа, лап и хвоста [25].

Ранее авторами отмечено, что при сравнении генетической структуры родительских пород и кросса Родник по полилокусным спектрам геномных районов локализации участков семи ретротранспозонов и одного ДНК транспозона (хелитрона) наибольшее сходство по ряду маркеров наблюдалось между белым великаном и синтетическим трехпородным кроссом Родник [26]. Цель исследования – выявить направления изменений генетической структуры в процессе селекции трехпородного кросса Родник путем проведения сравнительного анализа кросса и родительских пород по генотипам экзона 8 гена меланофилина (*mlph*), который участвует в дифференциации по окрасу советской шиншиллы и других пород кролика [22], и экзона 13.

Объекты и методы исследования

Эксперименты проведены в лаборатории геномики отдела биотехнологии Научно-исследовательского института пушного звероводства и кролиководства имени В. А. Афанасьева (НИИПЗК) на кроликах коллекции этого же института пород советская шиншилла ($n = 3$), калифорнийская ($n = 3$), белый великан ($n = 3$), кросс Родник ($n = 3$).

Забор крови в количестве 3–5 мл выполняли из ушной краевой вены. Из всех собранных образцов цельной крови с использованием набора реагентов для выделения ДНК «М-Сорб» (Синтол, Россия) экстрагировали геномную ДНК в соответствии с инструкциями производителя.

Исследования с участием животных выполнены в соответствии с Правилами надлежащей лабораторной практики и одобрены на заседании методической комиссии НИИПЗК.

Анализ структуры гена *mlph* у *Oryctolagus cuniculus* выполнен биоинформатическими методами с использованием нуклеотидной последовательности референсного генома UM_NZW_1.0 (GCF_009806435.1), представленного в базе данных GenBank (National Center for Biotechnology Information, США). Определение экзон-интронной структуры производилось в программе Splign. Условия и стадии проведения ПЦР,

а также дизайн праймеров к соответствующим участкам, охватывающим экзонные области гена, осуществлены с помощью онлайн версии программы BLAST3.

При постановке ПЦР использовали буфер с магнием 10×, 2,5 мкл, *Taq* полимеразы 0,2 мкл (1 е.а.), нуклеотиды по 0,2 мкмоль, праймеры 10 пмоль каждого добавляли в реакционную смесь. ПЦР выполнялась в реакционной смеси объемом 25 мкл в основном в следующих условиях: 94 °C/2 мин, 38 циклов 94 °C/30 с, 55–58 °C/30 с, 72 °C/30 с; 72 °C/2 мин.

Электрофоретическое разделение осуществлено на горизонтальном электрофореze и зафиксировано с использованием системы фотогельдокументации Quantum-ST4 (Vilber Lourmat, Франция).

Целевые фрагменты направлены в ООО «Синтол» для секвенирования.

Результаты и их обсуждение

У кролика ген меланофилина расположен на участке NW_026259270.1 (от 707632 до 743904, complement) референсного генома UM_NZW_1.0, состоит из 15 экзонов. К экзону 8 подобраны следующие праймеры: лидирующий – MLPN(Rabbit)EX8F-CTAAGA CAGAGCCCCGGGTTC и обратный – MLPN(Rabbit)EX8R-TCCCACTTCCTGTTGGGGTA. В результате получены фрагменты продуктов амплификации ожидаемой длины в 574 п.н. К охватываемому экзон 13 подобраны лидирующий праймер – MLPN(Rabbit)EX13F-GAGTCAGTCCCAAGCCCATG, обратный – MLPN(Rabbit)EX13R-GAGAGGTCTCATTTGGCCAG – 674 п.н.

На основании секвенированных фрагментов экзона 8 и 13 гена *mlph*, полученных с подобранными праймерами, выполнен сравнительный анализ результатов секвенирования у исходных пород кросса Родник (советская шиншилла, калифорнийская, белый великан) и самого кросса (разводимого «в себе»). Секвенирование экзона 8 по породам советская шиншилла и калифорнийская позволило выявить присутствие двух различных аллельных вариантов (гетерозиготы). При выравнивании последовательностей у исследованных пород отмечены две мононуклеотидные замены (рис. 3). У породы советская шиншилла в позиции 21 экзона 8 присутствовал гуанин (G), в позиции 32 – цитозин (C), что совпало с данными по породе ново-

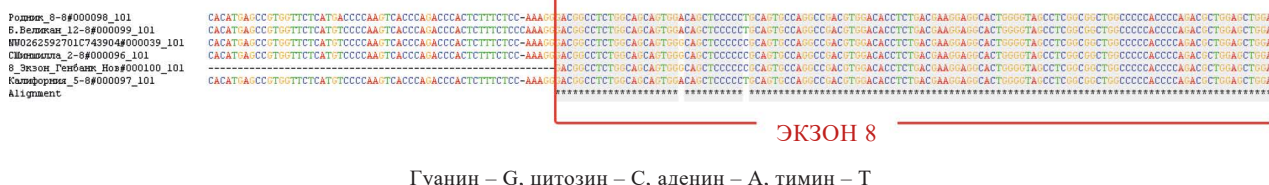


Рисунок 3. Выравнивание последовательности экзона 8 гена меланофилина у исследованных групп кроликов

Figure 3. Sequence alignment of *mlph* exon 8 in various rabbit breeds

зеландская белая, представленными в GenBank. У других исследованных пород в указанных позициях выявились нуклеотиды аденин (А) в позиции 21 и тимин (Т) в позиции 32. Таким образом, у животных кросса Родник, созданного в Научно-исследовательском институте пушного звероводства и кролиководства имени В. А. Афанасьева (НИИПЗК), и породы белого великана нуклеотиды в указанных позициях экзона 8 отличались от соответствующих нуклеотидов у пород советская шиншилла, калифорнийская и новозеландская белая (включая референсный геном последней и последовательности кДНК, полученной на матрице зрелой мРНК). На рисунках 4–7 стрелками указаны точки полиморфизмов.

Из приведенных хроматограмм (рис. 4–7) видно, что породы советская шиншилла и калифорнийская в экзоне 8 имели гетерозиготную композицию гаплотипов, что указывает на наличие циркуляции в популяции как минимум двух вариантов аллельных форм среди исследованных групп кроликов. При этом кролик кросса Родник, получаемый в результате сложной схемы скрещивания с участием нескольких роди-

тельских форм, имел гомозиготную форму данного экзона (рис. 6), как и кролики породы белый великан (рис. 7).

Таким образом, при анализе экзона 8 гена меланофилина установлено, что в образцах породы советская шиншилла и калифорнийская в нем присутствовали гетерозиготы. В образцах белого великана и кросса Родник гетерозиготы не выявлены.

При анализе результатов секвенирования экзона 13 у исследованных групп кроликов была обнаружена одна точка полиморфизма. У породы белый великан и кросса Родник в позиции 35 присутствовал нуклеотид G (рис. 8, 9), а у пород советская шиншилла, калифорнийская (рис. 10, 11), как и в последовательности новозеландского белого кролика (GenBank), – нуклеотид Т.

Однако, в отличие от экзона 8, в позиции 35 экзона 13 у пород советская шиншилла и калифорнийская этот аллельный вариант присутствовал в гомозиготе (рис. 10, 11). Следовательно, на основе этих экзонов можно выделить три варианта гаплотипов (табл. 1) по гену меланофилина:

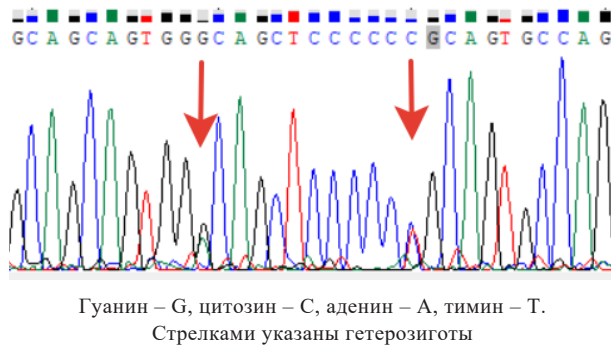


Рисунок 4. Точки полиморфизмов внутри экзона 8 у породы советская шиншилла

Figure 4. Polymorphism points within exon 8 in Soviet Chinchilla rabbits

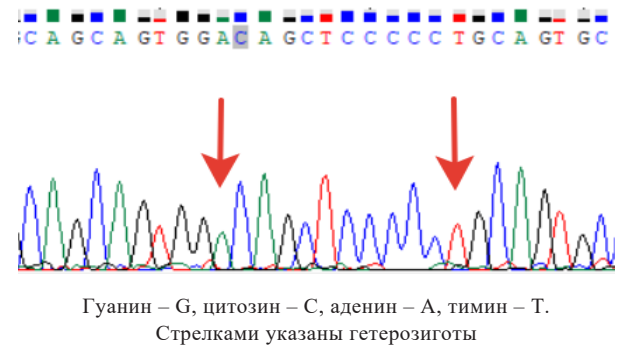


Рисунок 6. Точки полиморфизмов внутри экзона 8 у кросса Родник (НИИПЗК)

Figure 6. Polymorphism points within exon 8 in Rodnik rabbits

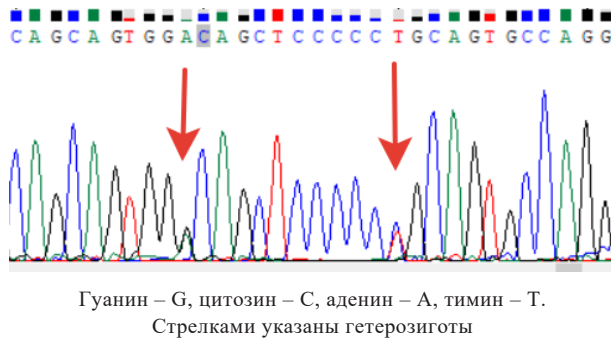


Рисунок 5. Точки полиморфизмов внутри экзона 8 у породы калифорнийская.

Figure 5. Polymorphism points within exon 8 in Californian rabbits

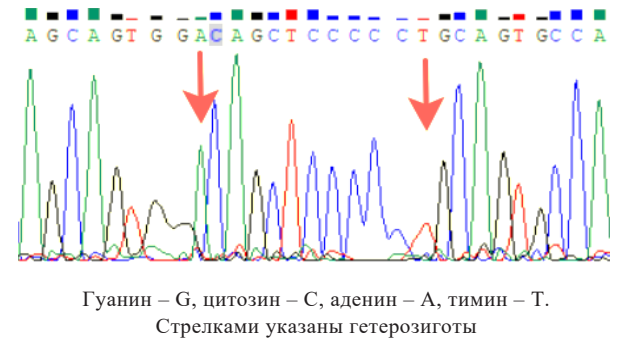


Рисунок 7. Точки полиморфизмов внутри экзона 8 у породы белый великан

Figure 7. Polymorphism points within exon 8 in White Giant rabbits

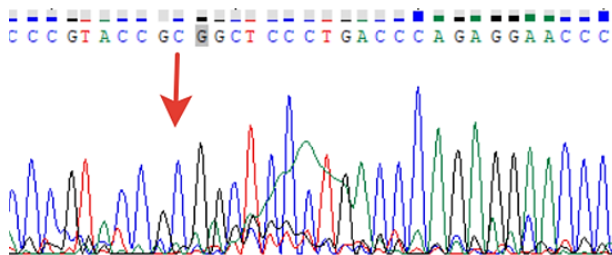


Рисунок 8. Точка полиморфизма внутри экзона 13 у кросса Родник (НИИПЗК)

Figure 8. Polymorphism point within exon 13 in Rodnik rabbits

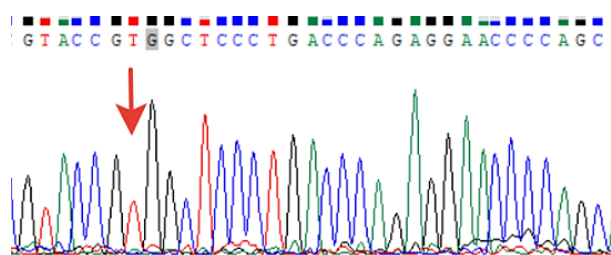


Рисунок 10. Точка полиморфизма внутри экзона 13 у породы советская шиншилла

Figure 10. Polymorphism point within exon 13 in Soviet Chinchilla rabbits

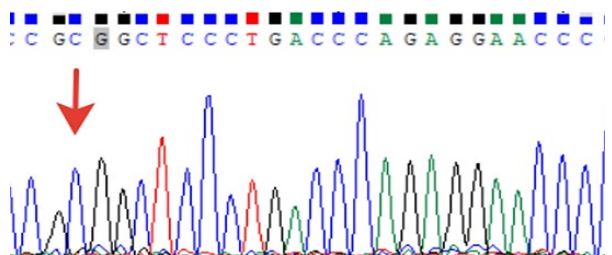


Рисунок 9. Точка полиморфизма внутри экзона 13 у породы белый великан

Figure 9. Polymorphism point within exon 13 in White Giant rabbits

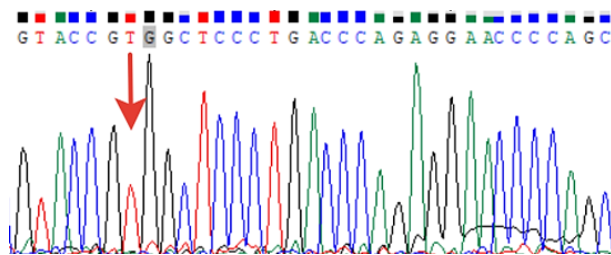


Рисунок 11. Точка полиморфизма внутри экзона 13 у породы калифорнийская

Figure 11. Polymorphism point within exon 13 in Californian rabbits

Таблица 1. Гаплотипы сочетаний нуклеотидов в экзонах 8 и 13 гена меланофилина у исследованных групп кроликов на примере калифорнийской породы

Table 1. Haplotypes of nucleotide combinations in *mlph* exons 8 and 13 in Californian rabbits

| Аллель | Экзон 8 | Экзон 13 | Породы |
|--------|--------------|----------|------------------------------------|
| А | 21(A), 35(T) | 35(T) | калифорнийская, советская шиншилла |
| Б | 21(G), 35(C) | 35(T) | калифорнийская, советская шиншилла |
| В | 21(A), 35(T) | 35(C) | кросс Родник, белый великан |

- (А) в экзоне 8 – позиции 21(A) и 35(T), в экзоне 13 – позиция 35(T);
- (Б) в экзоне 8 – позиции 21(G) и 35(C), в экзоне 13 – позиция 35(T);
- (В) в экзоне 8 – позиции 21(A) и 35(T), в экзоне 13 – позиция 35(C).

Можно выдвинуть следующую гипотезу эволюционного молекулярно-генетического характера появления указанных гаплотипов в экзоне 8 и аллельного варианта в экзоне 13. Появление и фиксация в процессе отбора новых полиморфизмов представляет собой материальную основу процесса эволюции, описанного Ч. Дарвином как накопление множества мельчайших изменений живой материи, в современном

понимании – ДНК. Вероятно, в данном случае у экзонах 8 и 13 гена меланофилина в геноме исследуемых групп кроликов наблюдаются различия по эволюционному возрасту аллельных вариантов этого гена. Можно предположить, что самым старым гаплотипом в экзоне 8 является вариант А. Кролики исследуемых образцов породы белый великан и кросса Родник оказались гомозиготными носителями гаплотипа В. В то же время исследуемые породы советская шиншилла и калифорнийская продемонстрировали наличие двух гаплотипов: более новой эволюционной формы – гаплотипа Б и более старой – гаплотипа А (табл. 1). Вариант мононуклеотидной замены в экзоне 13 – 35(C), вероятно, более старый, чем 35(T), поскольку встречается у кроликов породы белый великан и кросса Родник, в отличие от пород советская шиншилла и калифорнийская, а также и от референсного генома новозеландского белого кролика.

Анализ генетических расстояний, рассчитанных на основе полиморфизма высоко полиморфных геномных последовательностей групп кроликов, включая родительские породы кросса Родник и сам кросс, показал, что наиболее близкими оказались кролики породы белый великан и кросс Родник [26]. Это совпало с результатами, полученными для экзонах 8 и 13 гена меланофилина в настоящем исследовании.

Совпадение направления изменений генетической структуры трехпородного кросса Родник в сторону

родительской породы белый великан как по отдельным высокополиморфным фрагментам транспозонов, так и по SNP гена меланофилина, предположительно, не связано с изменчивостью окраса животных, а, скорее, обусловлено спецификой отбора, направленного на увеличение живой массы и репродуктивной функции животных [24]. Об этом свидетельствуют накапливаемые данные о полифункциональности мутаций гена меланофилина. Изменчивость их проявления может быть связана с полиморфизмом генов, вовлеченных в организацию таких внутриклеточных органелл, как лизосомы, меланосомы, а также с их внутриклеточным транспортом [8, 27] и взаимодействиями с циклин-зависимой киназой 1 (CDK1), которая влияет на пролиферацию меланоцитов и ингибировала апоптоз [28].

Экспрессия меланофилина в ряде опухолей участвует в регуляции эпителиально-мезенхимных переходов и метастазировании [29]. Существенное влияние на пигментацию, формирование и функцию меланосом оказывают потребление кальция митохондриями [30] и изменения кальция в клетке, влияющие на pH лизосом [31]. Предполагается, что именно взаимодействие меланофилина с такими элементами цитоскелета, как Rab27a (мембранный транспорт), актин, миозин, объясняет ассоциации изменений экспрессии меланофилина с адипогенезом и накоплением липидов у птиц [11]. MLRN играет важную роль в предотвращении избыточного накопления активных форм кислорода и перекисного окисления липидов как во время адипогенеза, так и в зрелых адипоцитах человека, что позволяет рассматривать меланофилин в качестве адипогенного фактора [32].

Изменения в уровне меланофилина могут влиять на динамику внутриклеточных процессов, поскольку он участвует в контроле клеточных сетей переключателей, управляющих подвижностью клеток, их ростом, полярностью, транспортировкой белков и экспрессией генов [9]. Например, установлено, что экспрессия меланофилина играет важную роль в панкреатических бета-клетках, формируя и транспортируя экзосомы, содержащие гранулы инсулина [33]. Описана высокая эволюционная консервативность доменов контакта с плазматической мембраной семейства синапто-тагмин-подобных белков, к которым принадлежит меланофилин [34]. Обнаружена высокая экспрессия меланофилина в тучных клетках [35], клетках миелоидного ряда, вовлеченных в различные иммунологические процессы и патологии [36], предположительно эволюционно наиболее древних клеточных популяций царства животных, выполняющих функции нейроиммунных центров [37].

Выводы

Впервые подобраны надежные праймеры и разработаны условия проведения ПЦР для воспроизводимого накопления ампликонов двух экзонов (из 15) гена меланофилина домашнего кролика. В ходе исследования в экзоне 8 выявлены два гаплотипа, в экзоне 13 – одна мононуклеотидная замена. Их сочетание делает трехпородный кросс Родник схожим с одной из родительских пород – белым великаном. Можно ожидать, что мутации в разных участках гена меланофилина, принимая во внимание полифункциональность кодируемого им белка и его связь с биогенезом меланосом, их внутриклеточным транспортом, а также с функцией лизосом, могут быть связаны не только с пигментацией, но и со способностью отражать состояние молекулярно-генетических систем. Эти системы принимают участие в формировании внутриклеточных органелл, их компартиментализации, транспорте, экзосомальных процессах. По-видимому, это свойство может лежать в основе связей между мутациями в гене меланофилина, изменениями его экспрессии, пигментации и ряда заболеваний, в том числе дефектов иммунной системы (например, при синдроме Грисцелли [38]), формирования липидных капель и отложения жира у птиц [39], а также между подавлением свободнорадикальных процессов в адипоцитах человека [32]. Таким образом, фиксация отдельных мутаций в гене меланофилина помогает отслеживать изменения в функциях других компонентов общего внутриклеточного метаболизма. Подобные изменения, которые отражаются мутациями, способствуют осуществлению отбора мутаций, не имеющих отношения к пигментации животных, в частности, у кроликов.

Критерии авторства

Все авторы внесли эквивалентный вклад в подготовку данной статьи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution

All authors contributed equally to the study and bear equal responsibility for the information published in this article.

Conflict of interest

The authors declared no conflict of interest regarding the publication of this article.

Список литературы / References

1. Carneiro M, Afonso S, Geraldés A, Garreau H, Bolet G, et al. The genetic structure of domestic rabbits. *Molecular Biology and Evolution*. 2011;28(6):1801–1816. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr003>

2. Щукина Е. С., Косовский Г. Ю., Глазко В. И., Кашапова И. С., Глазко Т. Т. Домашний кролик *Oryctolagus cuniculus* var. *domestica* L. как модель в изучении доместики и биомедицинских исследованиях (обзор). Сельскохозяйственная биология. 2020. Т. 55. № 4. С. 643–658. [Shchukina ES, Kosovsky GYu, Glazko VI, Kashapova IS, Glazko TT. Domestic rabbit *Oryctolagus cuniculus* var. *domestica* L. as a model in the study of domestication and biomedical researches (Review). The Agricultural Biology. 2020;55(4):643–658. (In Russ.)] <https://doi.org/10.15389/agrobiol.2020.4.643rus>
3. Dorożyńska K, Maj D. Rabbits – their domestication and molecular genetics of hair coat development and quality. *Animal Genetics*. 2021;52(1):10–20. <https://doi.org/10.1111/age.13024>
4. Bennett DC, Lamoreux ML. The color loci of mice – A genetic century. *Pigment Cell Research*. 2003;16(4):333–344. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2003.00067.x>
5. Alshanbari F, Castaneda C, Juras R, Hillhouse A, Mendoza MN, et al. Comparative FISH-mapping of *MC1R*, *ASIP*, and *TYRP1* in New and Old World camelids and association analysis with coat color phenotypes in the dromedary (*Camelus dromedarius*). *Frontiers in Genetics*. 2019;10:340. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00340>
6. Jia X, Ding P, Chen S, Zhao S, Wang J, et al. Analysis of *MC1R*, *MITF*, *TYR*, *TYRP1*, and *MLPH* genes polymorphism in four rabbit breeds with different coat colors. *Animals*. 2021;11(1):81. <https://doi.org/10.3390/ani11010081>
7. Neto MV, Hall MJ, Charneca J, Escrevente C, Seabra MC, et al. Photoprotective melanin is maintained within keratinocytes in storage lysosomes. *Journal of Investigative Dermatology*. 2025;145(5):1155–1165.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2024.08.023>
8. Schiaffino MV. Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2010;42(7):1094–1104. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.03.023>
9. Morstein J, Bowcut V, Fernando M, Yang Y, Zhu L, et al. Targeting Ras-, Rho-, and Rab-family GTPases via a conserved cryptic pocket. *Cell*. 2024;187(22):6379–6392.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.08.017>
10. Fukuda M, Kuroda TS, Mikoshiba K. Slac2-a/Melanophilin, the missing link between Rab27 and myosin Va: Implications of a tripartite protein complex for melanosome transport. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(14):12432–12436. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200005200>
11. Kim D-H, Lee J, Ko J-K, Lee K. *Melanophilin* regulates dendritogenesis in melanocytes for feather pigmentation. *Communications Biology*. 2024;7:592. <https://doi.org/10.1038/s42003-024-06284-5>
12. Martel JA, Michael D, Fejes-Tóth G, Náray-Fejes-Tóth A. Melanophilin, a novel aldosterone-induced gene in mouse cortical collecting duct cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2007;293(3):F904–F913. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00365.2006>
13. Posbergh CJ, Staiger EA, Huson HJ. A stop-gain mutation within *MLPH* is responsible for the lilac dilution observed in jacob sheep. *Genes*. 2020;11(6):618. <https://doi.org/10.3390/genes11060618>
14. Kosovsky GYu, Glazko VI, Abramov OI, Glazko TT. Melanophilin polymorphism in ferrets of different color. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2023;513(Suppl 1):S12–S17. <https://doi.org/10.1134/S1607672923700655>
15. Barral DC, Seabra MC. The melanosome as a model to study organelle motility in mammals. *Pigment Cell Research*. 2004;17(2):111–118. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2004.00138.x>
16. Mercer JA, Seperack PK, Strobel MC, Copeland NG, Jenkins NA. Novel myosin heavy chain encoded by murine *dilute* coat colour locus. *Nature*. 1991;349:709–713. <https://doi.org/10.1038/349709a0>
17. Wilson SM, Yip R, Swing DA, O’Sullivan TN, Zhang Y, et al. A mutation in *Rab27a* causes the vesicle transport defects observed in *ashen* mice. *PNAS*. 2000;97(14):7933–7938. <https://doi.org/10.1073/pnas.140212797>
18. Matesic LE, Yip R, Reuss AE, Swing DA, O’Sullivan TN, et al. Mutations in *Mlph*, encoding a member of the Rab effector family, cause the melanosome transport defects observed in *leaden* mice. *PNAS*. 2001;98(18):10238–10243. <https://doi.org/10.1073/pnas.181336698>
19. Lehner S, Gähle M, Dierks C, Stelter R, Gerber J, et al. Two-exon skipping within *MLPH* is associated with coat color dilution in rabbits. *PLOS One*. 2013;8(12):e84525. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084525>
20. Fontanesi L, Scotti E, Allain D, Dall’olio S. A frameshift mutation in the *Melanophilin* gene causes the dilute coat colour in rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) breeds. *Animal Genetics*. 2014;45(2):248–255. <https://doi.org/10.1111/age.12104>
21. Demars J, Iannuccelli N, Utzeri VJ, Auvinet G, Riquet J, et al. New insights into the Melanophilin (*MLPH*) gene affecting coat color dilution in rabbits. *Genes*. 2018;9(9):430. <https://doi.org/10.3390/genes9090430>
22. Li J, Chen Y, Liu M, Chen Q, Zhou J, et al. Association of Melanophilin (*MLPH*) gene polymorphism with coat colour in Rex rabbits. *World Rabbit Science*. 2020;28(1):29–38. <https://doi.org/10.4995/wrs.2020.12082>
23. Diribarne M, Mata X, Chantry-Darmon C, Vaiman A, Auvinet G, et al. A deletion in exon 9 of the *LIPH* gene is responsible for the Rex hair coat phenotype in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *PLOS One*. 2011;6(4):e19281. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019281>
24. Шумилина А. Р. Динамика продуктивных показателей кроликов при создании финального трехпородного кросса. Кролиководство и звероводство. 2019. № 6. С. 9–15. [Shumilina AR. Dynamics of productive indicators of rabbits when creating the final three-breed cross. *Krolikovodstvo i zverovodstvo*. 2019;(6):9–15. (In Russ.)] <https://elibrary.ru/KODPJY>

25. Косовский Г. Ю., Тинаев Н. И., Балакирев Н. А., Глазко В. И. Кролиководство. М.: Московский Двор; 2023. 352 с. [Kosovsky GYu, Tinaev NI, Balakirev NA, Glazko VI. Rabbit breeding. Moscow: Moskovskij Dvor; 2023. 352 p. (In Russ.)]
26. Колесник Е. С., Глазко В. И., Глазко Т. Т., Косовский Г. Ю. Внутривидовая дифференциация домашнего кролика (*Oryctolagus cuniculus*) с использованием IRAP-PCR. Кролиководство и звероводство. 2022. № 5. С. 33–42. [Kolesnik ES, Glazko VI, Glazko TT, Kosovsky GYu. Intraspecific differentiation of the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) using IRAP-PCR. Krolikovodstvo i zverovodstvo. 2022;(5):33–42. (In Russ.)] https://doi.org/10.52178/00234885_2022_5_33
27. Bueschbell B, Manga P, Schiedel AC. The many faces of G protein-coupled receptor 143, an atypical intracellular receptor. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2022;9:873777. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.873777>
28. Dai Y, Hu S, Bai S, Li J, Yang N, et al. *CDK1* promotes the proliferation of melanocytes in Rex rabbits. *Genes & Genomics*. 2022;44:1191–1199. <https://doi.org/10.1007/s13258-022-01283-4>
29. Wei M, Yang X, Yang X, Huang Y, Yuan Z, et al. *MLPH* regulates EMT in pancreatic adenocarcinoma through the PI3K-AKT signaling pathway. *Journal of Cancer*. 2024;15(17):5828–5838. <https://doi.org/10.7150/jca.94573>
30. Tanwar J, Ahuja K, Sharma A, Sehgal P, Ranjan G, et al. Mitochondrial calcium uptake orchestrates vertebrate pigmentation via transcriptional regulation of keratin filaments. *PLOS Biol*. 2024;22(11):e3002895. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002895>
31. Sharma N, Sharma A, Motiani RK. A novel gain of function mutation in *TPC2* reiterates pH-pigmentation interplay: Emerging role of ionic homeostasis as a master pigmentation regulator. *Cell Calcium*. 2023;111:102705. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2023.102705>
32. Kim M-Y, Kim Y-H, Park E-R, Shin Y, Kim GH, et al. *MLPH* is a novel adipogenic factor controlling redox homeostasis to inhibit lipid peroxidation in adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2024;734:150459. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2024.150459>
33. Wang H, Mizuno K, Takahashi N, Kobayashi E, Shirakawa J, et al. Melanophilin accelerates insulin granule fusion without predocking to the plasma membrane. *Diabetes*. 2020;69(12):2655–2666. <https://doi.org/10.2337/db20-0069>
34. Chon NL, Tran S, Miller CS, Lin H, Knight JD. A conserved electrostatic membrane-binding surface in synaptotagmin-like proteins revealed using molecular phylogenetic analysis and homology modeling. *Protein Science*. 2024;33(1):e4850. <https://doi.org/10.1002/pro.4850>
35. Babina M, Franke K, Bal G. How “neuronal” are human skin mast cells? *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(18):10871. <https://doi.org/10.3390/ijms231810871>
36. Мачарадзе Д. Ш. Тучные клетки и триптаза. Современные представления. *Медицинская иммунология*. 2021. Т. 23. № 6. С. 1271–1284. [Macharadze DSh. Mast cells and tryptase. Modern aspects. *Medical Immunology (Russia)*. 2021; 23(6):1271–1284. (In Russ.)] <https://doi.org/10.15789/1563-0625-MCA-2193>
37. Григорьев И. П., Коржевский Д. Э. Тучные клетки в головном мозге позвоночных – локализация и функции. *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2021. Т. 57. № 1. С. 17–32. [Grigorev IP, Korzhevskii DE. Mast cells in the vertebrate brain: localization and functions. *Zhurnal evolyutsionnoi biokhimii i fiziologii*. 2021;57(1):17–32. (In Russ.)] <https://doi.org/10.31857/S0044452921010046>
38. Castaño-Jaramillo LM, Lugo-Reyes SO, Cruz Muñoz ME, Scheffler-Mendoza SC, Duran McKinster C, et al. Diagnostic and therapeutic caveats in Griscelli syndrome. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2021;93(6):e13034. <https://doi.org/10.1111/sji.13034>
39. Kim DH, Lee J, Suh Y, Chen PR, Lee K. Up-regulation of *Melanophilin (MLPH)* gene during avian adipogenesis and decreased fat pad weights with adipocyte hypotrophy in *MLPH* knockout quail. *Poultry Science*. 2024;104(2):104720. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.104720>