Научная статья
УДК 571.27
doi:10.35694/YARCX.2025.70.2.008

НАБЛЮДАЕМЫЕ ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ TLR2 И TLR3 ВРОЖДЁННОГО ИММУНИТЕТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Александр Евгеньевич Калашников[1], Любовь Александровна Калашникова[2]
[1, 2]Всероссийский научно-исследовательский институт племенного дела,
Лесные Поляны, Россия
[1]aekalashnikov@yandex.ru, ORCID 0000-0003-1600-7357
[2]lakalashnikova@mail.ru, ORCID 0000-0002-9760-5254

Реферат. Актуальность проведённого исследования обусловлена повышенной восприимчивостью крупного рогатого скота к биогенным факторам производственной среды. Врождённый иммунный ответ у скота определяется генетической вариабельностью, особенно полиморфизмами в генах, таких как TLR2 и TLR3, которые связаны с распознаванием бактериальных и вирусных паттернов. Новизна работы заключалась в анализе влияния генетических вариаций (SNV) в указанных генах на изменчивость белковых молекул и оценку вероятности фенотипических проявлений заболеваний. Цель исследования заключалась в оценке генетической вариабельности полиморфизмов генов рецепторов TLR2 и TLR3 и их связи с иммунным ответом. В ходе работы были проведены анализ вариабельности рецепторов, генотипирование образцов, анализ нуклеотидной и белковой структуры, а также оценка регуляции транскрипции, что дало возможность оценить ассоциации между полиморфизмами и устойчивостью к заболеваниям. Исследование охватило 192 SNV, дополненных данными из общедоступных ресурсов (более 10 тыс. полиморфизмов), что привело к определению двух вариантов сплайсинга для TLR2 и одного для TLR3. Моделирование и фильтрация данных выявили 41 вариант SNV с высокой структурной значимостью. В результате фильтрации были отмечены 39 значимых вариантов SNV, включая миссенс-вариант, связанный с паратуберкулёзом, показывающий высокую клиническую значимость. Генотипирование показало, что в популяции крупного рогатого скота генотип аллеля А не преобладал. Внесено предположение о том, что полиморфизм в TLR2 может снижать иммунный ответ на липополисахариды. Определённые SNV в TLR2 и TLR3 могут существенно влиять на иммунный ответ и служить новыми генетическими маркерами для селекции, что имеет практическое значение для разработки новых методов диагностики и направления селекции, предназначенных для повышения устойчивости крупного рогатого скота к инфекционным заболеваниям.

Ключевые слова: *генетические маркеры, QTL, паратуберкулёз, TLR, крупный рогатый скот, иммунный ответ*

OBSERVED POLYMORPHISMS OF TLR2 AND TLR3 GENES OF BOVINE INNATE IMMUNITY

Aleksandr E. Kalashnikov[1], Lyubov' A. Kalashnikova[2]
[1, 2]All Russian Research Institute of Animal Breeding, Lesnye Polyany, Russia
[1]aekalashnikov@yandex.ru, ORCID 0000-0003-1600-7357
[2]lakalashnikova@mail.ru, ORCID 0000-0002-9760-5254

Abstract. The relevance of the conducted research is due to the increased susceptibility of cattle to biogenic factors of the production environment. The innate immune response in cattle is determined by genetic variability, especially polymorphisms in genes such as TLR2 and TLR3, which are associated with the recognition of bacterial and viral patterns. The novelty of the work was the analysis of the effect of genetic variation (SNV) in these genes on the variability of protein molecules and the assessment of the probability of phenotypic disease manifestations. The goal of research was to assess the genetic variability of TLR2 and TLR3 receptor gene polymorphisms and their relationship to the immune response. In the course of the work, an analysis of receptor variability, genotyping of samples, analysis of nucleotide and protein structure, as well as an assessment of transcriptional regulation were carried out, which made it possible to assess the associations between polymorphisms and disease resistance. The research covered 192 SNV supplemented with data from publicly available resources (more than 10 thousand polymorphisms), which resulted in the identification of two splicing variants for TLR2 and one for TLR3. Modeling and data filtering revealed 41 SNV variants with high structural significance. As a result of filtration, 39 significant SNV variants were noted, including the missense

variant associated with paratuberculosis which shows high clinical significance. Genotyping showed that the A allele genotype was not predominant in the cattle population. It has been suggested that polymorphism in TLR2 may reduce the immune response to lipopolysaccharides. Certain SNV in TLR2 and TLR3 can significantly affect the immune response and serve as new genetic markers for selection, which is of practical importance for the development of new diagnostic methods and direction of selection designed to increase the resistance of cattle to infectious diseases.

Keywords: *genetic markers, QTL, paratuberculosis, TLR, cattle, immune response*

Введение. Иммунитет у животных, особенно у крупного рогатого скота, играет ключевую роль в защите от инфекционных заболеваний, таких как паратуберкулёз и мастит, наносящих значительный ущерб животноводству [1]. Врождённый иммунитет активируется сразу после проникновения патогенов, а рецепторы Толл (TLR) важны для распознавания молекул-паттернов [2].

Данное исследование анализирует гены TLR2 и TLR3 у крупного рогатого скота, фокусируясь на одиночных нуклеотидных вариантах (SNV) и их влиянии на фенотипические признаки и иммунный ответ [3]. Выявленные генетические маркеры могут быть использованы для разработки новых методов диагностики и селекции, что повысит устойчивость к инфекционным заболеваниям и продуктивность животных [4].

Важным аспектом подобных исследований также является изучение полиморфизма гена BoLA-DRB3 (комплекс MHC) как фактора устойчивости к лейкозу [5]. Кроме того, методика экономической оценки пород скота может помочь в выборе наиболее устойчивых и продуктивных животных [6]. Влияние аутбридинга и инбридинга на молочную продуктивность пород также подчеркивает важность генетических факторов в селекции [7].

Цель данного исследования заключается в оценке генетической вариабельности полиморфизмов TLR2 и TLR3, их связи с иммунным ответом и идентификации количественных локусов (QTL), ассоциированных с устойчивостью к инфекциям.

Материалы и методы. В исследовании анализировались однонуклеотидные полиморфизмы (SNV) у 192 особей и данные о SNV генов TLR2 и TLR3 (n = 10197 и 19990). Биологический материал был собран от чистопородных животных (n = 226). Использовались базы данных Ensembl и Animal Genome [3].

Фильтрация данных проводилась с использованием алгоритмов VEP [2], а аннотирование SNV, связанных с восприимчивостью к паратуберкулёзу, – dbSNP и HGVC. Амплификация генетического материала выполнялась методом РТ-ПЦР с последующим анализом по RFLP [3]. Статистический анализ проводился с использованием языка R.

Результаты и обсуждение. Исследование полиморфизмов в генах TLR2 и TLR3 у крупного рогатого скота выявило значительную гетерогенность нуклеотидных и белковых последовательностей. Анализ ранее выявленных 192 вариантов и дополнительных 10197/19990 SNV для TLR2 и TLR3 из открытых источников показал клинически значимые вариации, влияющие на иммунный ответ при заболевании паратуберкулёзом и маститом.

Молекулярное моделирование, проведённое на основе выявленных SNV, позволило отобрать 41 вариант с высокой клинической значимостью, среди которых замена аминокислот в LRR-домене TLR2 (Glu/Asp) была связана с уменьшением экспрессии TLR2 и нарушением взаимодействия с лигандами.

Анализ полиморфизмов в генах TLR2 и TLR3 у крупного рогатого скота выявил значительную гетерогенность в нуклеотидных и в белковых последовательностях. Были идентифицированы по одному варианту сплайсинга для обоих генов, а также два и более 30 значимых варианта для TLR2 и TLR3 соответственно. Ключевым результатом стало открытие в гене TLR2 миссенс-варианта (c. 184 C>A), связанного с паратуберкулёзом (*Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*), который имел частоту минорного аллеля (MAF) 0,4 и оценку SIFT в диапазоне от 0,1. Этот вариант находится в LRR-домене TLR2, что указывает на его влияние на взаимодействие с патогенами и влияет на молекулярную структуру LRR-домена [8–9].

Анализ показал, что изменение в нуклеотидной последовательности приводило к замене аминокислот в белках. В частности, замена аминокислоты в критической области LRR-домена TLR2 снижала способность рецептора эффективно распознавать молекулы, что ослабляло иммунный ответ [8]. Генотипирование популяции чистопородных животных показало, что генотип AA не превалировал, но встречался в аборигенных породах России часто, что свидетельствовало об адаптивной ценности в условиях отбора (рис. 1).

На рисунке 1 представлены частоты генотипов и аллелей TLR2 среди различных популяций коров. Для Архангельской популяции указали частоты генотипов: 39% AA, 34% CA, 27% CC и частоты аллелей: 73% – для аллеля A и 27% – для аллеля C. В Иране частоты генотипов составили 38% AA, 38% CA, 25% CC, а частоты аллелей: 56% – для аллеля A и 44% – для аллеля C. Аборигенная популяция Индии показала частоты генотипов: 57%

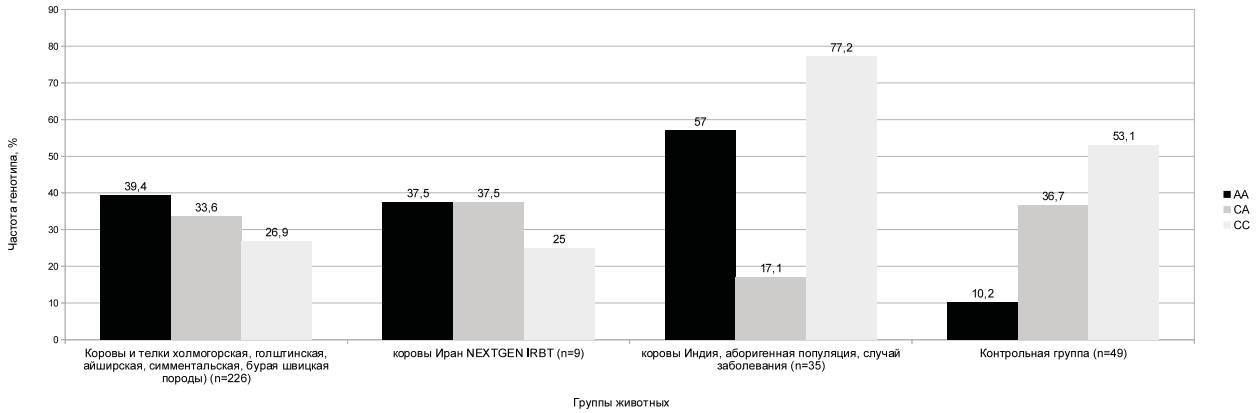

Рисунок 1 – Наблюдаемая частота аллелей для маркера TLR2 c. 184 C>A

AA, 17% CA, 25% CC и частоты аллелей: 77% – для аллеля A и 23% – для аллеля C. В контрольной группе частоты генотипов составили 10% AA, 37% CA, 53% CC, а частоты аллелей: 29% – для аллеля A и 71% – для аллеля C. Таблица продемонстрировала значительное разнообразие в частотах аллелей TLR2 среди исследуемых популяций коров. Преобладание аллеля A наблюдалось в большинстве популяций, кроме контрольной группы, где доминировал аллель C.

На рисунке 2 представлены данные о гетерозиготности и равновесии популяций животных по критерию Харди-Вайнберга.

Уровень полиморфизма в холмогорской и голштинской породах составил PIC 0,29, а в аборигенной популяции Индии – 0,27, что указывало на умеренное генетическое разнообразие. Наблюдаемая гетерозиготность для холмогорской и голштинской пород составила 0,31, близко к ожидаемой 0,34, что свидетельствовало о близости к равновесию. Величину PIC для отечественных популяций не рассчитывали, т. к. её заменяла статистика Фишера. В аборигенной популяции Индии наблюдаемая гетерозиготность составила 0,25, без данных об ожидаемой. Аллельное разнообразие для холмогорской и голштинской пород составило 0,44, в то время как данные для индийской популяции отсутствовали. Низкие значения χ^2 (0,037 и 0,026) подтвердили равновесие по Харди-Вайнбергу для обеих популяций, в то время как аборигенная популяция Ирана потребует дополнительных исследований для оценки своей генетической структуры.

В ходе исследования перекрытий с известными регуляторными и структурными мотивами не выявлено. Сегодня полиморфизм аннотирован в пяти известных сборках генома скота. Мутация была протестирована с использованием ПЦР-ПДФР с рестрикцией эндонуклеазой EcoRV в популяциях чистопородных животных. Показано, что замена аминокислоты в критическом участке LRR-домена снижает способность рецептора связываться с молекулами-паттернами (Glu на Asp) и приводит к снижению иммунного ответа на липополисахариды (LPS) бактерий [9–10], что впоследствии уменьшает экспрессию TLR2 и нарушает взаимодействие рецептора с лигандом.

Анализ белковых структур показал, что изменения в нуклеотидных последовательностях вли-

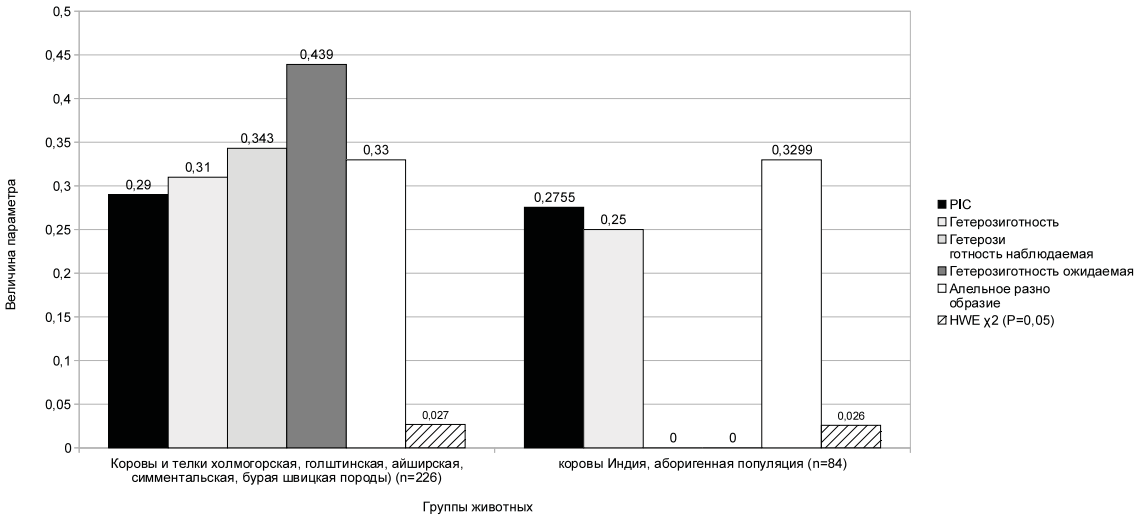

Рисунок 2 – Гетерозиготность и данные равновесия популяций

яют на функциональность рецепторов. В частности, замены аминокислот в LRR-домене TLR2 могут снижать его способность взаимодействовать с лигандами, что, в свою очередь, затрагивает активацию иммунного ответа. Это подчеркивает необходимость изучения молекулярных механизмов иммунного ответа и их связи с генетическими вариациями.

Проведён анализ роли количественных признаков (QTL) в иммунном ответе и их влияния на фенотипические характеристики, такие как устойчивость к заболеваниям. На сегодняшний момент идентифицировали значительное количество QTL, аннотированных по семи доступным геномным сборкам. Среди них >190 тыс. относились к SNP, >350 – к CNV, >340 – к PCR-RFLP, >280 – к известным гаплотипам, а только один – к маркерам STR. Это разнообразие маркеров подчеркивало их важность в генетических исследованиях.

Основное внимание в исследовании уделялось аллелям, связанным с изменениями в состоянии вымени, иммунным ответом на паратуберкулёз и туберкулёз, а также с такими характеристиками, как развитие, жизнеспособность, продуктивность, качество молока, репродукция и экстерьер. Наибольшее количество QTL было связано именно с молочными характеристиками, что подчеркивало их значимость для молочного скотоводства. Признаки репродукции и производства также были представлены в значительной степени, что указывало на внимание селекционеров к улучшению этих характеристик в селекционных планах.

По анализу типов маркеров обнаружили, что наиболее распространёнными и важными в контексте генетических исследований были SNP. Также играли значительную роль в понимании генетической вариабельности другие маркеры, такие как CNV и PCR-RFLP. Низкое количество QTL для микросателлитов и сигналов селекции могло указывать на их меньшую значимость.

Сравнительный анализ по видам животных показал, что наибольшее количество SNP и CNV относилось к крупному рогатому скоту, что свидетельствовало о генетической гетерогенности его генома. Значительные показатели также демонстрировали свиньи, в то время как у других видов наблюдалось меньшее количество маркеров. Примечательно, что для свиней и овец наблюдается в последние годы активизация программ селекции и разведения [9–11].

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства сельского хозяйства Российской Федерации за 2023–2027 гг.

Выводы. Таким образом, в исследовании полиморфизмов в генах TLR2 и TLR3 у крупного рогатого скота была проанализирована генетическая вариабельность, влияющая на иммунный ответ на патогены, такие как паратуберкулёз. Выявлено значительное количество QTL, что подчеркивает важность генетической вариабельности для селекции на устойчивость к инфекциям. Оценка аллелей, связанных с состоянием вымени и продуктивностью, показала влияние полиморфизмов TLR2 и TLR3 на иммунный ответ.

Генетическое разнообразие в холмогорской и голштинской популяциях оказалось умеренным и находилось в равновесии по Харди-Вайнбергу, что свидетельствует о стабильности их генетической структуры. Для аборигенной популяции Индии требуются дополнительные исследования. Результаты подтверждают, что полиморфизмы в TLR2 и TLR3 могут быть использованы для разработки маркер-опосредованных стратегий селекции, что улучшит продуктивность и здоровье скота.

Список источников

1. El-Zayat S. R., Sibaii H., Mannaa F. A. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview // Bulletin of the National Research Centre. 2019. Vol. 43, № 1. P. 1–12. DOI 10.1186/s42269-019-0227-2.

2. Сулимова Г. Е., Лазебная И. В., Рузина М. Н. [и др.] Полиморфизм гена BoLA-DRB3 у быков-производителей костромской породы как генетический фактор устойчивости к лейкозу // Ветеринария. 2014. № 6. С. 24–27. EDN SFMOZF.

3. Середа Н. А., Фадеева Г. В., Люлько Г. А. Методика сравнительной экономической оценки пород крупного рогатого скота // АПК: экономика, управление. 2019. № 4. С. 57–63. DOI 10.33305/194-57. EDN BTBFWF.

4. Баранова Н. С., Королев А. А., Казаков Д. С. Влияние аутбридинга и инбридинга на молочную продуктивность коров костромской породы // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2024. Т. 54, № 6. С. 80–88. DOI 10.26898/0370-8799-2024-6-8. EDN RGTTDY.

5. McLaren W., Gil L., Hunt S. E. [et al.] The Ensembl Variant Effect Predictor // Genome Biology. 2016. Vol. 17 (1):122. DOI 10.1186/s13059-016-0974-4.

6. Bhaladhare A., Sharma D., Chauhan A. [et al.] Association study of Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) in Toll-like Receptor 9 gene with bovine tuberculosis // Indian Journal of Animal Research. 2018. Vol. 52, Is. 4. P. 533–537. DOI 10.18805/ijar.v0iOF.7257.

7. Khan M. Z., Wang J., Ma Y. [et al.] Genetic polymorphisms in immune- and inflammation-associated genes and their association with bovine mastitis resistance/susceptibility // Frontiers in Immunology. 2023. Vol. 14. P. 1082144. DOI 10.3389/fimmu.2023.1082144.

8. Mukherjee S., Patra R., Behzadi P. [et al.] Toll-like receptor-guided therapeutic intervention of human cancers: molecular and immunological perspectives // Frontiers in Immunology. 2023. Vol. 14. P. 1244345. DOI 10.3389/fimmu.2023.1244345.

9. Duan T., Du Y., Xing C. Toll-like receptor signaling and its role in cell-mediated immunity // Frontiers in Immunology. 2022. Vol. 13. P. 812774. DOI 10.3389/fimmu.2022.812774.

10. Oliveira-Nascimento L., Massari P., Wetzler L. M. The role of TLR2 in infection and immunity // Frontiers in Immunology. 2012. Vol. 3. P. 79. DOI 10.3389/fimmu.2012.00079.

11. Knap P. W. Pig Breeding for Increased Sustainability // Animal Breeding and Genetics. 2022. P. 139–179. DOI 10.1007/978-1-0716-2460-9_342.

References

1. El-Zayat S. R., Sibaii H., Mannaa F. A. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview // Bulletin of the National Research Centre. 2019. Vol. 43, № 1. P. 1–12. DOI 10.1186/s42269-019-0227-2.

2. Sulimova G. E., Lazebnaya I. V., Ruzina M. N. [i dr.] Polimorfizm gena BoLA-DRB3 u bykov-proizvoditelej kostromskoj porody kak geneticheskij faktor ustojchivosti k lejkozu // Veterinariya. 2014. № 6. S. 24–27. EDN SFMOZF.

3. Sereda N. A., Fadeeva G. V., Lyul'ko G. A. Metodika sravnitel'noj ekonomicheskoj ocenki porod krupnogo rogatogo skota // APK: ekonomika, upravlenie. 2019. № 4. S. 57–63. DOI 10.33305/194-57. EDN BTBFWF.

4. Baranova N. S., Korolev A. A., Kazakov D. S. Vliyanie autbridinga i inbridinga na molochnuyu produktivnost' korov kostromskoj porody // Sibirskij vestnik sel'skohozyajstvennoj nauki. 2024. T. 54, № 6. S. 80–88. DOI 10.26898/0370-8799-2024-6-8. EDN RGTTDY.

5. McLaren W., Gil L., Hunt S. E. [et al.] The Ensembl Variant Effect Predictor // Genome Biology. 2016. Vol. 17 (1):122. DOI 10.1186/s13059-016-0974-4.

6. Bhaladhare A., Sharma D., Chauhan A. [et al.] Association study of Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) in Toll-like Receptor 9 gene with bovine tuberculosis // Indian Journal of Animal Research. 2018. Vol. 52, Is. 4. P. 533–537. DOI 10.18805/ijar.v0iOF.7257.

7. Khan M. Z., Wang J., Ma Y. [et al.] Genetic polymorphisms in immune- and inflammation-associated genes and their association with bovine mastitis resistance/susceptibility // Frontiers in Immunology. 2023. Vol. 14. P. 1082144. DOI 10.3389/fimmu.2023.1082144.

8. Mukherjee S., Patra R., Behzadi P. [et al.] Toll-like receptor-guided therapeutic intervention of human cancers: molecular and immunological perspectives // Frontiers in Immunology. 2023. Vol. 14. P. 1244345. DOI 10.3389/fimmu.2023.1244345.

9. Duan T., Du Y., Xing C. Toll-like receptor signaling and its role in cell-mediated immunity // Frontiers in Immunology. 2022. Vol. 13. P. 812774. DOI 10.3389/fimmu.2022.812774.

10. Oliveira-Nascimento L., Massari P., Wetzler L. M. The role of TLR2 in infection and immunity // Frontiers in Immunology. 2012. Vol. 3. P. 79. DOI 10.3389/fimmu.2012.00079.

11. Knap P. W. Pig Breeding for Increased Sustainability // Animal Breeding and Genetics. 2022. P. 139–179. DOI 10.1007/978-1-0716-2460-9_342.

Сведения об авторах

Александр Евгеньевич Калашников – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории ДНК технологий отдела генетики сельскохозяйственных животных, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт племенного дела», spin-код: 2087-2029.

Любовь Александровна Калашникова – доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник – заведующий лабораторией ДНК технологий, руководитель отдела генетики сельскохозяйственных животных, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт племенного дела», spin-код: 8451-0320.

Information about the authors

Aleksandr E. Kalashnikov – Candidate of Biological Sciences, Leading Research Officer at the Laboratory of DNA Technologies of the Department of Genetics of Farm Animals, All Russian Research Institute of Animal Breeding, spin-code: 2087-2029.

Lyubov' A. Kalashnikova – Doctor of Biological Sciences, Full Professor, Chief Research Officer – Head of the Laboratory of DNA Technologies, Head of the Department of Genetics of Farm Animals, All Russian Research Institute of Animal Breeding, spin-code: 8451-0320.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.