

УДК: 575:577.59:636.9

## ПОЛИМОРФИЗМ МЕЛАНОФИЛИНА У ХОРЬКОВ РАЗНОГО ОКРАСА

© 2024 г. Член-корреспондент Г. Ю. Косовский\*, В. И. Глазко,  
О. И. Абрамов, Т. Т. Глазко

Поступило 20.10.2023 г.

После доработки 08.11.2023 г.

Принято к публикации 10.11.2023 г

У млекопитающих основной вклад в изменчивость пигментации вносят две группы генов, непосредственно связанные с метаболическими путями синтеза пигментов и контролирующими транспорт в меланоцитах меланосом к кератиноцитам. С целью выявления генетических основ вариантов такой изменчивости выполнено сравнение нуклеотидных последовательностей гена меланофилина у двух групп хорьков – серебристого окраса и животных дикого типа с использованием секвенирования 16 экзонов. У носителей серебристого окраса выявлена мононуклеотидная делеция в 9-м экзоне, приводящая к сдвигу рамки считывания и образованию ниже по течению стоп-кодона. Мутантный белок почти полностью лишен С концевой домена, ответственного за контакт меланосом с актином при их продвижении к периферии меланоцитов, но сохраняет лидирующий домен, участвующий в формировании меланосом. Сочетание сохранности N домена и дефекта С домена мутантного белка впервые позволяет объяснить неполное доминирование белка дикого типа у гетерозигот.

*Ключевые слова:* меланофилин, секвенирование, делеция, экзоны, окрас, хорьки

DOI: 10.31857/S2686738924010197, EDN: KHDSXD

### ВВЕДЕНИЕ

Пигментация кожи и волос является важным показателем у млекопитающих, часто связанным с целым рядом физиологических характеристик, в том числе с предрасположенностью к врожденным и инфекционным заболеваниям [1]. Изменчивость окраса шерсти у животных сельскохозяйственных видов, как правило, имеет прямое отношение к породной принадлежности. Окрас шерсти имеет высоко полигенную основу, к настоящему времени описано 378 генов, которые вовлечены в формирование окраски шерсти у млекопитающих [2, 3]. Среди них можно выделить группы генов, продукты которых участвуют в синтезе собственно меланинов в меланоцитах и другие, ответственные за формирование меланосом и их продвижения к кератиноцитам. Обнаружено, что существенный вклад в разнообразие окраса млекопитающих вносят гены второй группы, в частности, мутации гена

меланофилина (*mlph*), продукт которого участвует в транспорте зрелых меланосом и их накоплению на дендритных концах меланоцитов. Мутации гена *mlph* описаны у разных видов и связаны с ослаблением пигментации. Такое ослабление описано у ряда видов птиц [4, 5], собак [6], кроликов [7], кошек [8], американских норок [9, 10], крупного рогатого скота бельгийской голубой породы [11], овец [12, 13]. У карликовых пород кроликов нарушение сплайсинга и появление стоп-кодона гена *mlph* приводило к выпадению из мРНК 3 и 4 экзонов, формированию укороченного белка и, соответственно, уменьшению скопления меланосом [14]. Мононуклеотидная делеция в экзоне 5 гена *mlph*, приводящая к сдвигу рамки считывания, может приводить к такому же разбавлению цвета шерсти кроликов [15]. У хорька не проводились исследования влияния мутаций гена *mlph* на окрас животных.

У кролика последовательность гена *mlph* включает 15 экзонов, белок MLPN кролика по содержанию 562 аминокислот (NP\_001284414) оказался короче по сравнению с белками человека и мыши, состоящими из 600 (NP\_077006) и 590 (NP\_443748) аминокислот соответственно. N- и C-домены MLPN, связывающиеся с такими белками, вовлеченными в транспорт меланосом, как Rab27A и актин, консервативны у человека и мыши, а срединный до-

ФГБНУ Научно-исследовательский институт пушиного звероводства и кролиководства им. В.А. Афанасьева, Московская обл., Раменский р-н, пос. Родники, Россия.

\*E-mail: gkosovsky@mail.ru

мен, связывающий миозин VA, имеет выраженную видовую специфику [16].

Таким образом, ген *mlph* постепенно становится наиболее многообещающим геном-кандидатом для исследования вариантов пигментации у млекопитающих.

В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы было выполнение секвенирования гена *mlph* группы хорьков с разными окрасами, сравнение результатов у животных с серебристым фенотипом с хорьками дикого типа, а также оценка потенциального влияния отличий в секвенированных последовательностях на окрас животных.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения анализа гена меланофелина взяты 5 образцов шкурок классического и 5 образцов серебристого хорька (зверохозяйство “Русский Соболь”, Пушкино), в дальнейшем обозначенные как дикий и мутантный типы соответственно.

Для выделения ДНК использовался метод фенол-гуанидин-хлороформной экстракции, реагенты для выделения ДНК/РНК приобретены в фирме ООО “Евродиагностика Био” и использованы в соответствии с протоколом производителя.

Для подбора праймеров выполнен анализ нуклеотидной последовательности гена меланофелина у хорька (Genbank number >NW\_025422021.1) с учетом необходимости амплификации не только экзонов, но и небольших участков прилегающих к ним интронов. Разбивка изучаемого гена на интроны и экзоны проведена в программе Splign (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/splign/splign.cgi?textpage=online&level=form>). Подбор праймеров к экзонам выполнен в программе Primer 3 (<https://primer3.ut.ee/>). Валидация и отбор выбранных праймеров произведен через он-лайн базу GenBank программой Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Праймеры синтезированы в ООО “Евроген”.

Смесь для реакции ПЦР готовили в следующих пропорциях: ПЦР буфер 10x – 2.5 мкл, образец ДНК – 5 мкл, нуклеотиды (0.2 мМ) – 2.5 мкл, праймеры (20 пмоль) – 2.5 мкл, ДНК полимеразы – 1 е.а. Базовая программа амплификации – 95°C, старт – 94°C – 10 сек., 62°C – 10 сек. – 40 циклов, 72°C – 10 сек., 24°C – хранение. Электрофорез проводился в ТАЕ буфере или ТБЕ буфере, на 1.8% агазоре, с добавлением 10 мкл раствора 1% бромистого этидия на 100 мл геля.

После получения однородных и чистых ПЦР продуктов, ампликоны передавались в компанию ООО “Синтол” для секвенирования. Получен-



Рис. 1. Хроматограмма секвенса, содержащая мутацию. Сверху приведен аналогичный участок гена *mlph* у хорька дикого типа, снизу – мутантный тип (выделено прямоугольником).

ные хроматограммы сиквенса проанализированы программой Chromas (<https://technelysium.com.au/wp/chromas/>), выравнивание и сравнение последовательностей выполнено программой ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>). Выявленные полиморфизмы верифицированы в ручном режиме при помощи анализа хроматограмм сиквенса.

Анализ полученных хроматограмм сиквенсов позволил получить следующие данные. Хорьки серебристого окраса отличались от темноокрашенных дикого типа мутациями гена *mlph* по типу инверсии 2х нуклеотидов и делецией одного, примерно в середине 9-го экзона (рис. 1). Мутантная последовательность приводит к образованию стоп кодона на примерно 200 аминокислот раньше у серебристых хорьков в гомозиготе относительно белка дикого типа.

Нами проведена оценка нуклеотидной последовательности дикого и серебристого аллельных вариантов путем компьютерного построения зрелой РНК дикого и мутантного типов с последующей реконструкцией соответствующих аминокислотных

последовательностей с использованием программы Transcription and Translation Tool (<https://biomodel.uah.es/en/lab/cybertory/analysis/trans.htm>). Полученные результаты представлены на рис. 2.

Можно увидеть (рис. 2), что обнаруженная мутация в 9 экзоне приводит к сдвигу рамки считывания по сравнению с диким типом (рис. 2, выделены курсивом). Первая мутантная аминокислота имеет номер 327 и представляет замену аминокислоты серин у дикого типа MLPH на аминокислоту треонин у мутантного типа. Далее в аминокислотной позиции 373 образуется стоп-кодон, приводя к формированию укороченной формы белка MLPH у хорьков серебристой окраски.

Белок MLPH имеет 3 функциональных домена: N-участок содержит домен, связывающийся с белком Rab27A, который, в свою очередь, взаимодействует с меланосомами. Центральный участок связывается с моторным протеином MyoVa, C-концевой участок взаимодействует с актином при доставке меланосом к дендритам меланоцитов [17]. Обнаруженная мутация находится в аминокислотной позиции 327, а измененная после-

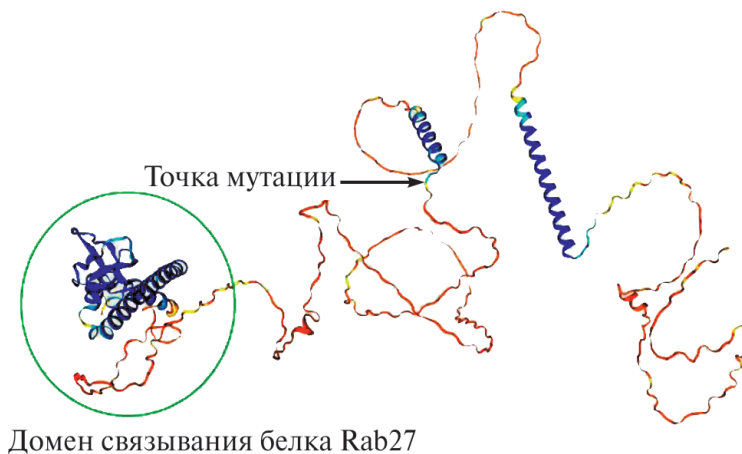
Аминокислотная последовательность белка меланофилина дикого типа

MGRKLDLSKLTDEEAKHVWEVQRDFDLRRKEERLEGLKGRIKKESSQRELLADTAH  
 LNETHCARCLQPYRLLATPRRQCLDCRLFTCQNC SHAHP EEQGWLCDPCHLARVVKIGS  
 LEWYHQHLRARFKRFGSAKVIRSLCGRLQGAGLPDRARGSPDIHSGPDASAGEGSGDSE  
 QTDEDGELDTAAQAQPIGSKKKRLSIHDLDFEADSDDDSTWSGSHPPDSSPVPAAMDLSLQ  
 VPCAQFTTDEPCA KDASPEAMVAPGCHPPPEEQTDSLSPAGQDTLTELCPGESRR TAL  
 GTAAAAGKSITR SERLPSQYLAEMDTSEDDGE SPGAPHA AFHPCGGGGH T P S Q S Q C L P G C  
EPTDADRE EET LRRKLEELTSHISDQ GASSEEEGSK EEEAELDRSPSIRDLP GAGLEVSGAVGQ  
TYRQETIPGDPQDLVQPSRTTDKELLEDRVAVTASEVHQVESEVSNIKSKIAALQAAGLTVK  
PSGKPRRKS NLPIFLPRLAERLDRNPKDPNADPMEEMTVAPYLLRRKFTNSPKSQGKDGISFH  
RQ SAYRGS LTQRNPNSRKGVANHSFAKPVMT HQP

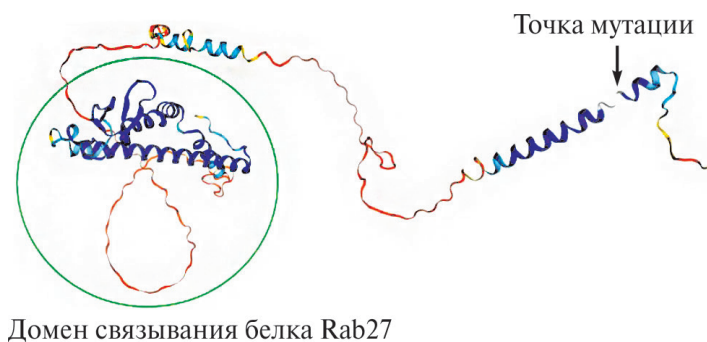
Аминокислотная последовательность белка меланофилина  
 мутантного «серебристого» типа

MGRKLDLSKLTDEEAKHVWEVQRDFDLRRKEERLEGLKGRIKKESSQRELLADTAH  
 LNETHCARCLQPYRLLATPRRQCLDCRLFTCQNC SHAHP EEQGWLCDPCHLARVVKIGS  
 LEWYHQHLRARFKRFGSAKVIRSLCGRLQGAGLPDRARGSPDIHSGPDASAGEGSGDSE  
 QTDEDGELDTAAQAQPIGSKKKRLSIHDLDFEADSDDDSTWSGSHPPDSSPVPAAMDLSLQ  
 VPCAQFTTDEPCA KDASPEAMVAPGCHPPPEEQTDSLSPAGQDTLTELCPGESRR TAL  
 GTAAAAGKSITR SERLPSQYLAEMDTSEDDGE T P G L P T L P S T H A E E E A T P R P R V S V S Q A A S P  
QMRTEKRRP SGG SWRS

**Рис. 2.** Сравнение аминокислотных последовательностей дикой и мутантной форм меланофилина. Для наглядности мы выделили одинаковые у двух форм последовательности аминокислот зеленым цветом, а различающиеся – желтым и курсивом. Первая измененная аминокислота выделена также подчеркиванием.



**Рис. 3.** Структура меланофилина дикого типа. Слева кружком выделен домен связывания с белком Rab27A. Далее по последовательности присутствуют две альфа-цепи. Первая из них относится к домену связывания миозина, вторая — входит в состав функционального домена связывания актина. Точка мутации, присутствующая в аналогичной последовательности мутантного белка, отмечена стрелкой.



**Рис. 4.** Структура меланофилина мутантного типа. Кружком выделен домен связывания белка Rab27a. Мутантная аминокислота отмечена стрелкой. Последовательность аминокислот после точки мутации не соответствует аналогичной последовательности в диком типе. Присутствующие на данном рисунке две альфа-цепи не являются аналогичными альфа-цепям в белке дикого типа.

довательность длится до аминокислоты номер 372 и затем обрывается. Мутантный белок полностью теряет С концевой домен связывания с актином, а также имеет измененный домен связывания с миозиновым белком MyoVa.

Выполнено 3D моделирование структур форм MLPN дикого и мутантного типов при помощи программы для построения трехмерных моделей (<https://swissmodel.expasy.org>), результаты которого представлены на рис. 3 и 4.

Можно увидеть, что выявленная мутация характеризуется глубокими конформационными изменениями в структуре белка MLPN, существенными также для изменений его функциональных харак-

теристик. Первое очевидное отличие — мутантный белок гораздо короче своего дикого аналога (372 аминокислотных остатков против 579). Далее, в диком типе две альфа-спирали аминокислотных остатков расположены после точки мутации (рис. 3), в мутантном же типе происходит не только обрыв синтеза белка из-за стоп-кодона, но и изменения третичной структуры в области, предшествующей точке мутации. Это происходит, по-видимому, из-за наличия в мутантном белке небольшого участка с измененной последовательностью аминокислот после точки мутации и до стоп-кодона (рис. 4). В результате взаимодействия с новой последовательностью (рис. 3), конформация домена, связывающегося с миозином, изменяется — появ-

ляются две новые альфа-спирали, отсутствующие в белке дикого типа.

Далее нами проведен подробный трехмерный анализ структуры N-концевого домена белка MLPH, связывающегося через Rab27A с органеллами, накапливающими меланин – меланосомами (на рис. 3 и 4 выделены кружками). Этот домен полностью сохраняет свою третичную структуру, не подвергается конформационным изменениям в результате наличия измененного участка после точки мутации.

Полученные данные согласуются с фенотипическими наблюдениями о том, что серебристый окрас наследуется по типу неполного доминирования. То есть в гетерозиготных особях по данной мутации наблюдается не полная потеря цвета, а лишь ослабление, обесцвечивание окраски. Можно ожидать, что это происходит в результате эффекта конкурентного ингибирования дикой формы MLPH и мутантной. Мутантный белок лишен способности к транспорту, но сохраняет интактным домен связывания с меланосомами. В результате происходит конкуренция между двумя формами белка за связывание с меланосомами и полноценному дикому белку удается транспортировать к дендритам меланоцитов гораздо меньшее количество меланосом. В результате мы имеем следующую фенотипическую картину: дикие по MLPH хорьки окрашены типично, гомозиготы по мутантному типу почти полностью белые, гетерозиготы имеют ослабленный окрас и белые пятна в различных частях шкурки.

В общем, в результате выполненного исследования обнаружены отличия между нуклеотидными последовательностями экзона 9 MLPH у хорьков с серебристым окрасом и животными дикого типа. Выявленная мутация – мононуклеотидная делеция в 9 экзоне MLPH – сдвигает рамку считывания и укорачивает длину белка. Впервые описан один из источников изменчивости пигментации млекопитающих с неполным доминированием белка дикого типа за счет сохранения функциональной активности лидирующего домена, ответственного за формирование меланосом, но повреждения терминального домена, участвующего в их транспорте, у мутантного белка.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов для проведения экспериментов, образцы шкур получены из зверохозяйства (“Русский Соболь”, Пушкино). От каждого автора было получено информированное добровольное согласие.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ermini L., Francis J. C., Rosa G. S., et al.* Evolutionary selection of alleles in the melanophilin gene that impacts on prostate organ function and cancer risk // *Evol Med Public Health.* 2021. V. 9 (1). P. 311–321.
2. *Alshanbari F., Castaneda C., Juras R., et al.* (2019) 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*) // *Front Genet.* 2019. V. 10. P. 340.
3. *Jia X., Ding P., Chen S., et al.* Analysis of MC1R, MITF, TYR, TYRP1, and MLPH Genes Polymorphism in Four Rabbit Breeds with Different Coat Colors // *Animals (Basel).* 2021. V. 11 (1). P. 81.
4. *Vaez M., Follett S. A., Bed'hom B., et al.* A single point-mutation within the melanophilin gene causes the lavender plumage colour dilution phenotype in the chicken // *BMC Genet.* 2008. V. 9. P. 7.
5. *Bed'hom B., Vaez M., Coville J. L., et al.* The lavender plumage colour in Japanese quail is associated with a complex mutation in the region of MLPH that is related to differences in growth, feed consumption and body temperature // *BMC Genomics.* 2012. V. 13. P. 442.
6. *Bauer A., Kehl A., Jagannathan V., et al.* A novel MLPH variant in dogs with coat colour dilution. *Anim Genet.* 2018. V. 49 (1). P. 94–97.
7. *Demars J., Iannuccelli N., Utzeri V. J., et al.* New Insights into the Melanophilin (MLPH) Gene Affecting Coat Color Dilution in Rabbits // *Genes (Basel).* 2018. V. 9 (9). P. 430.
8. *Ishida Y., David V. A., Eizirik E., et al.* A homozygous single-base deletion in MLPH causes the dilute coat color phenotype in the domestic cat // *Genomics.* 2006. V. 88 (6). P. 698–705.
9. *Cirera S., Markakis M. N., Christensen K., et al.* New insights into the melanophilin (MLPH) gene controlling coat color phenotypes in American mink // *Gene.* 2013. V. 527 (1). P. 48–54.
10. *Manakhov A. D., Andreeva T. V., Trapezov O. V., Kolchanov N. A., Rogaev E. I.* Genome analysis identifies the mutant genes for common industrial Silverblue and Hedlund white coat colours in American mink // *Sci Rep.* 2019. V. 9 (1). P. 4581.
11. *Li W., Sartelet A., Tamma N., et al.* Reverse genetic screen for loss-of-function mutations uncovers a frameshifting deletion in the melanophilin gene accountable for a distinctive coat color in Belgian Blue cattle // *Anim Genet.* 2016. V. 47 (1). P. 110–113.
12. *Posbergh C. J., Staiger E. A., Huson H.* A Stop-Gain Mutation within MLPH Is Responsible for the Lilac Dilution Observed in Jacob Sheep // *Genes (Basel).* 2020. V. 11 (6). P. 618.

13. *Kalds P., Zhou S., Gao Y., et al.* Genetics of the phenotypic evolution in sheep: a molecular look at diversity-driving genes // *Genet Sel Evol.* 2022. V. 54 (1). P. 61.
14. *Lehner S., Gähle M., Dierks C., et al.* Two-exon skipping within MLPH is associated with coat color dilution in rabbits // *PLoS One.* 2013. V. 8 (12). P. e84525.
15. *Fontanesi L., Scotti E., Allain D., et al.* A frameshift mutation in the melanophilin gene causes the dilute coat colour in rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) breeds // *Anim Genet.* 2013. V. 45 (2). P. 248–55.
16. *Demars J., Iannuccelli N., Utzeri V.J., et al.* New Insights into the Melanophilin (MLPH) Gene Affecting Coat Color Dilution in Rabbits // *Genes (Basel).* 2018. V. 9 (9). P. 430.
17. *Hume A. N., Tarafder A.K., Ramalho J. S., et al.* A coiled-coil domain of melanophilin is essential for Myosin Va recruitment and melanosome transport in melanocytes // *Mol Biol Cell.* 2006. V. 17 (11). P. 4720–4735.

## MELANOPHILIN POLYMORPHISM IN FERRETS OF DIFFERENT COLORS

**Corresponding Member of the RAS G. Yu. Kosovsky<sup>#</sup>, V. I. Glazko,  
O. I. Abramov, T. T. Glazko**

*Afanas'ev Research Institute of Fur-Bearing Animal Breeding and Rabbit Breeding,  
pos. Rodniki, Ramenskii Region, Moscow Province, Russian Federation*

<sup>#</sup>*E-mail: gkosovsky@mail.ru*

In mammals, the main contribution to the variability of pigmentation is made by two groups of genes directly related to the metabolic pathways of pigment synthesis and controlling the transport of melanosomes in melanocytes to keratinocytes. In order to identify the genetic basis of pigmentation variants, the nucleotide sequences of the melanophilin gene were compared in two groups of ferrets – silver-colored and wild-type animals using sequencing of 16 exons. In carriers of silver color, a single nucleotide deletion was detected in the 9th exon, leading to a shift in the reading frame and the formation of a stop codon downstream. The protein encoded by the mutant allele is almost completely devoid of the C terminal domain of the protein responsible for the contact of melanosomes with actin during their moving to the periphery of melanocytes, but it retains the leading domain involved in the formation of melanosomes. The combination of the preservation of the N domain and the defect of the C domain of the mutant protein for the first time makes it possible to explain the incomplete dominance of the wild-type protein in heterozygotes.

*Keywords:* melanophilin, sequencing, deletion, exons, color, ferrets