

# Интенсивность окраса у собак связана с модификацией количества копий (CNV) выше кодирующей последовательности гена KITLG

<https://www.mdpi.com/2073-4425/11/1/75/htm>

Авторы: Кали Вайч, Верена Аффольтер, Дэниел Йорк, Роберт Ребхун, Роберт Гран, Анжелика Калленберг, Даника Баннаш

Получено: 10 декабря 2019 г. / Исправлено: 6 января 2020 г. / Принято: 8 января 2020 г. / Опубликовано: 9 января 2020 г.

(Эта статья относится к Специальному выпуску «Генетика окрасов шерсти»)

## Извлечение

У собак огромное разнообразие окрасов шерсти, и было найдено множество генов, контролирующих выработку пигментов, внешний вид и их распределение. Некоторые породы, подобные Толлерам (*прим. пер.: Новошотландский Ретривер*), имеют большое разнообразие в интенсивности пигментации феомеланина, которые не возможно объяснить известными генетическими вариантами. Полногеномный поиск ассоциаций, сравнивающий светло-красный и темно-красный окрас шерсти у собак породы Толлер, выявил большую связанную с этим признаком область на хромосоме 15 (CFA 15:23 Mb – 38 Mb) (*прим. пер.: Полногеномный поиск ассоциаций - исследования, связанные с установлением связей между геномными вариантами и фенотипическими признаками*). Анализ зоны наблюдения данных о последовательности полного генома восьми собак выявил зону, содержащую 6 копий (CNV) на 152 kb выше гена KITLG. Генотипирование с помощью droplet PCR технологии (ddPCR) подтвердило связь между большим количеством копий для темно-красного окраса шерсти у Толлеров. Так же у пуделей и у собак других пород была выявлена связь между количеством копий CNV и интенсивностью окраса на основе эумеланином, так и феомеланина. Более того, от количества копий зависела интенсивность пигмента вдоль стержня волоса как в феомеланиновой, так и в эумеланиновой оболочке. KITLG играет важную роль в меланогенезе, и модификация числа копий выше кодирующей последовательности KITLG были связаны с вариациями цвета шерсти у мышей, а также с цветом волос у людей, что согласуется с его аналогичной ролью и у домашних собак.

## 1. Введение

Собака, *Canis familiaris*, была одомашнена от волков (*Canis lupus*), точное время и место, где это произошло, до сих пор остаются предметом научных дискуссий. Хотя у волков есть некоторые вариации окрасов, большая часть их приглушена для улучшения маскировки. Черный окрас у волков получен позже от собак, что потенциально даёт преимущество при охоте в ночное время. Варианты окрасов шерсти как светлые, так и тёмные были идентифицированы ещё 10 000 лет до нашей эры при археологических находках собак, что указывает на то, что вариации окрасов существовали на раннем этапе истории одомашнивания собак. В середине 16 века были написаны картины с изображением собак самых разных окрасов шерсти, которое к тому времени имелись у собак. Одним из примеров этого картины «Охотники в снегу» Питера Брейгеля Старшего (1565 г.), на которой изображены охотничьи собаки с насыщенными красными, коричневыми и черными окрасами. Современные породы собак появились в последние пару сотен лет, и в наши дни многие породы демонстрируют поразительную интенсивность пигмента по сравнению с более приглушенными окрасами их предков, волков.

Определены основные типы окрасов шерсти домашних собак. Как и у других млекопитающих, существуют жёлтый (феомеланин) и черный (эумеланин) пигменты, производство которых контролируется генами переключения типа пигмента, кодирующими рецептор меланокортина 1 (MC1R) (*прим. пер.: локус E*) и сигнальный белок агути (ASIP) (*прим. пер.: локус A*). MC1R представляет собой рецептор, связанный с G-белком, экспрессируемый меланоцитами. Передача сигналов его лигандом, гормоном, стимулирующим а-

меланоциты (MC1R), способствует синтезу эумеланина. Нарушение передачи сигналов MC1R происходит при экспрессии белка ASIP, что приводит к синтезу феомеланина. У волков импульс экспрессии ASIP происходит во время роста волос, что приводит к полосатому распределению пигмента в волосах, особенно на спине. Варианты, которые изменяют ASIP или MC1R, могут влиять на производство феомеланина или эумеланина. Сплошные рыжие или красные собаки имеют мутацию, связанную с потерей функции рецептора MC1R, которая приводит к производству единственного пигмента феомеланина. И рецессивный вариант ASIP с потерей функции, и доминантный вариант с усилением функции в гене, кодирующем  $\beta$ -дефенсин 103 (CBD103), могут приводить к черному окрасу шерсти у собак.

Найдены генетические варианты, изменяющие основные окрасы шерсти. Породы с исключительным продуцированием феомеланина, которые имеют белый или светло-кремовый окрас шерсти имеют миссенс-вариант (*прим. пер.: missense variant - точечная мутация, в результате которой начинается кодирование другой аминокислоты*) гена MFSD12 (*прим. пер.: ii*). Разбавление пигмента у некоторых собак может быть так же результатом вариантов потери функции в гене MLPH (*прим. пер.: dd*), кодирующем меланофилин, что приводит к аномальному скоплению пигмента в волосе и кератиноцитах. Коричневый цвет шерсти у собак является примером осветления эумеланина и обусловлен рецессивными аллелями в TYRP1 (*прим. пер.: bb*), которые нарушают выработку пигментов эумеланина. Внешний вид собак, окрас которых зависит от феомеланина, может варьироваться от кремового до темно-красного с идентичными гомозиготными аллелями потери функции в MC1R (*прим. пер.: ee*) и MFSD12 (*прим. пер.: ii*), что указывает на наличие дополнительных локусов, которые могут влиять на интенсивность пигментации у собак.

В этом исследовании генетическая основа фенотипов светло- и темно-красного феомеланина была оценена с использованием полногеномного поиска ассоциаций у собак породы Толлер путём анализа последовательности на основе данных обо всём геноме. Было обнаружено, что ранее идентифицированные вариации числа копий (CNV) на хромосоме 15 выше кодирующей последовательности KITLG связаны с интенсивностью красного цвета у Толлеров. (*прим. пер.: Вариация числа копий (англ. Copy number variation, CNV) — вид генетического полиморфизма, к которому относят различия индивидуальных геномов по числу копий хромосомных сегментов различного размера. CNV возникают в результате несбалансированных хромосомных перестроек в результате неравного кроссинговера.*) Корреляция фенотипа и генотипа по спектру окрасов шерсти в разных породах собак показывает, что этот локус определяет интенсивность пигмента эумеланина и феомеланина. Количественный анализ цвета в волосе показывает, что низкая интенсивность пигмента, приводящая к более светлому цвету, происходит из-за меньшего количества пигмента у основания волоса. И наоборот, высокая интенсивность пигментации возникает, когда волосы равномерно пигментированы.

## 2. Материалы и методы

### 2.1. Сбор образцов и извлечение ДНК

Образцы крови и слюны были собраны у собак через Ветеринарную медицинскую клинику Дэвиса Калифорнийского университета (VMTH) или отправлены на исследование непосредственно от владельцев собак и ветеринаров. Сбор проводился под наблюдением Институционального комитета по уходу и использованию животных Калифорнийского университета в Дэвисе (протокол № 20356). Геномную ДНК из образцов крови экстрагировали с использованием набора Qiagen Genra Puregene (QIAGEN, Валенсия, Калифорния, США). Образцы слюны собирали с помощью тампонов Performagene Animal Collection (DNA Genotek, Оттава, Канада). Информация о породе, дате рождения, поле и окрасе были предоставлены владельцами.

### 2.2. Полногеномный поиск ассоциаций

Производился однонуклеотидный вариант (SNV) генотипирования 35 собак породы Толлер на чипе Illumina Canine HD 170 K BeadChip (Illumina, Сан-Диего, Калифорния, США), которые сопоставляли с эталонным геномом CanFam2.0. Собаки были разделены на светлые ( $n = 23$ ) и тёмные ( $n = 13$ ) на основании визуального осмотра их окраса шерсти. Собак осматривали лично или по фотографиям при рассеянном освещении и оценивались они одним человеком. Контроль качества и анализ ассоциации хи-квадрат проводился с помощью PLINK 1.9. Все образцы имели уровень генотипирования не менее 90%. Менее 5% собак были исключены из исследования из-за частоты минорного аллеля, и ещё около 5% собак были

исключены из-за степени генотипирования ниже 90%. Окончательный анализ был выполнен с 105 678 SNV, а значимость для всего генома была оценена на основе порога Бонферрони ( $p \leq 4,7 \times 10^{-7}$ ). Рисунки были созданы с помощью пакетов R qqman, GenABEL и cgmisc.

### 2.3. Секвенирование всего генома

Полногеномное секвенирование (*прим. пер.*: секвенирование - определение их аминокислотной или нуклеотидной последовательности) 100 геномов собак было выполнено, как описано у Brown et al. Тринадцать собак породы Толлер из них 6 светлых, 6 средних и 1 темно-красный и 1 Ирландский сеттер (темно-красный). Глубина секвенирования составляла в среднем 8,7, и считывания были сопоставлены с эталонным геномом собаки (CanFam 3.1). Варианты из CanFam3.1 chr15: 23–38 Мб были проверены на гомозиготную сегрегацию со светлым или темным окрасом шерсти. Варианты были проверены так же для людей, мышей и крыс с помощью трека 4-Way Multiz Alignment and Conservation в браузере генома UCSC CanFam2. Прогнозирование вариантов биологических последствий выполнялось с помощью Ensembl Variant Effect Predictor (VEP). Анализ в регионе, окружающем CNV (chr15: 29 800 000–29 850 000), был выполнен с помощью igvtools в скользящих окнах размером 2 КБ для каждого образца. Затем было использована нормализация каждого образца по эталонному геному и графически отображено в Microsoft Excel.

### 2.4. Цифровое капельное ПЦР-генотипирование

Количественное определение количества копий образцов выполняли с помощью анализа цифровой капельной ПЦР (ddPCR) на системе BioRad QX200 Droplet Digital System (BioRad, Hercules, CA, USA). Праймеры для CNV KITLG были сконструированы из эталонного генома CanFam3.1 (F: GAGTAGGTGTAATTTACCGGACA, R: AGCTATTTGCACAGGCTTTT, зонд: CCCATCCATCTTTACSTTCAGAAACA) с 5'-FAM (флуоресцентный краситель, окрашенный в черный цвет) Интегрированные ДНК-технологии (IDT, Коралвилл, Айова, США). Анализ контрольного гена на протоонкоген 1 ETS (ETS1) был разработан BioRad с использованием красителя HEX (гексахлор-флуоресцеин) в области, консервативной для таксона chr5 млекопитающих: 6,166,572–6,166,747 (BioRad Assay ID: 10042961). Перед ПЦР ДНК расщепляли рестрикционным ферментом New England Biosciences AvaII (продукт № R0153L, NEB, Ипсвич, Массачусетс, США). Число копий рассчитывали с использованием стандартного протокола программного обеспечения BioRad QX200 как отношение положительных капель KITLG к положительным каплям ETS1 по всем принятым каплям. Концентрации образца и праймера были оптимизированы для получения отдельных матриц для каждой капли. Статистический анализ результатов и построение фигур выполняли с помощью GraphPad Prism Version 8 (GraphPad, Сан-Диего, Калифорния, США). Для оценки различий между темным и светлым окрасом шерсти у Толлеров и Пуделей использовали тест Манна-Уитни.

### 2.5. Количественный анализ пигмента волос

Информация об окрасе шерсти Пуделей была получена от владельцев (т. е. красный, абрикосовый, кремовый, белый, черный, серебристый и т. д.). Для таких пород, как Толлер, в которых цветовые вариации не распознаются при регистрируй окраса собаки, дальнейшая количественная оценка цвета шерсти от корня до кончика была выполнена путём фотографирования шерсти собак в рассеянном свете с использованием серой карты фотографии WhiBal G7 (Майкл Тарес Дезайн, Мельбурн, Австралия). Интенсивность цвета измерялась с помощью Adobe Photoshop в трех экземплярах по 50 пикселей у корня и кончика на одной фотографии. Среднюю интенсивность корня / кончика сравнивали с результатами ddPCR и оценивали на предмет статистической значимости с помощью теста линейной регрессии в GraphPad Prism.

## 3. Результаты

### 3.1. Полногеномный поиск ассоциаций (GWAS) для светло и темно красных Толлеров

Собаки породы Толлер имеет окрасы шерсти от светло-золотисто-рыжего до темно-медно-красного (Рисунок 1А по стандарту породы АКС). Ни один из ранее идентифицированных генов не объясняет эту фенотипическую изменчивость окраса шерсти этих собак. GWAS был выполнен для идентификации области в геноме, которая связана с изменением окраса шерсти, с использованием 23 собак породы Толлер

светло-рыжего окраса и 13 темно-красных. Все собаки были дикого типа для ранее идентифицированного варианта MFSD12 (ортолога человеческого варианта rs751,585,493 (ENST00000355415: Chr19: 3,557,253 G>A (C>T у собак); p. (Arg51Cys))), связанного с более светлой шерстью феомеланина. цвет [12]. Один SNV был значимым для всего генома с  $p_{\text{Bonferroni}} < 0,05$  на CanFam2 chr15: 32 383 555 (CanFam 3.1 chr15: 29 371 013) ( $p_{\text{raw}} = 3,09 \times 10^{-8}$ ,  $p_{\text{Bonferroni}} = 0,0033$ ) (рис. 1B). Анализ равновесия по сцеплению (LD) выявил очень большую критическую область на 15-й хромосоме CanFam 2 от 23 до 38 МБ (CanFam3.1 chr15: 20–35 МБ) со значениями  $r^2 > 0,8$  по отношению к наиболее ассоциированному SNV (рис. 1C).

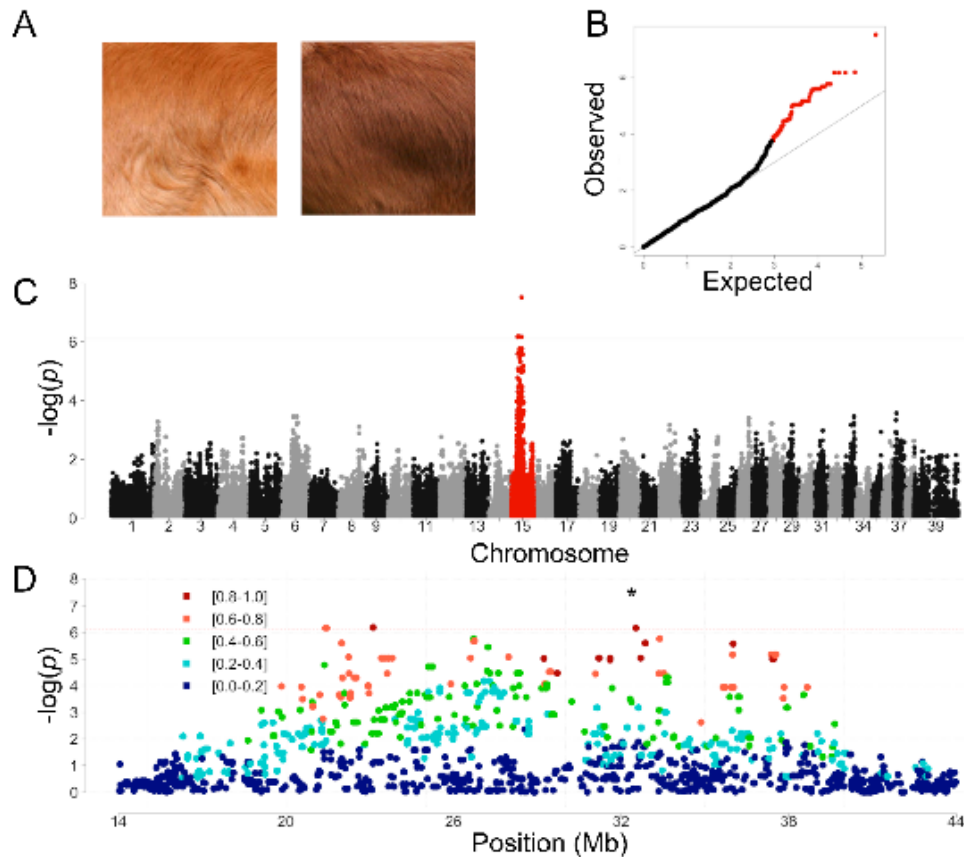


Рисунок 1. Полногеномный поиск ассоциаций окраса шерсти у собак породы Толлер.

(A) Фотографии типичной шерсти собак породы Толлер светло-красного (слева) и темно-красного (справа) окраса.

(B) График GWAS, показывающий инфляцию генома  $\lambda$  1,03. SNV хромосомы 15 выделены красным.

(C) Манхэттенский график. Один локус на хромосоме 15 (красный) достиг общегеномной значимости после коррекции Бонферрони (CanFam2 chr15: 32 383 555,  $p_{\text{raw}} = 3,09 \times 10^{-8}$ ,  $p_{\text{Bonferroni}} = 0,0033$ ). Сплошная линия указывает значимость для всего генома на основе поправки множественного тестирования Бонферрони.

(D) SNV из области 30 Мб, окружающей наиболее связанный SNV (обозначено \*). SNV имеют цветовую кодировку по значению  $r^2$ , чтобы показать неравновесие по сцеплению в регионе. Красная пунктирная линия указывает порог Бонферрони.

### 3.2. Полное секвенирование генома и анализ охвата

При первоначальном скрининге возможных вариантов были исследованы парные полногеномные последовательности шести светло-рыжих Толлеров одного темно-красного Толлера и одного темно-красного Ирландского сеттера на предмет вариантов в критической области, окружающей наиболее ассоциированный SNV. Было идентифицировано 81 560 вариантов SNV и 53 277 вариантов с небольшими вставками / делециями (indel), и 112 из этих вариантов были выделены по интенсивности окраски шерсти (90 SNV и 22 варианта). Ни один из этих 112 вариантов не кодировал белок, и ни один из вариантов не находился в высоко консервативных областях генома. Эта область также была визуально проверена в файлах выравнивания для выявления крупных отступов или структурных изменений, которые не были идентифицированы программным обеспечением для вызова вариантов, и был проведен поиск литературы для выявления любых известных крупных структурных вариантов в этом регионе. Предварительный анализ выровненных последовательностей вышеупомянутых восьми собак плюс ещё шесть средние-рыжих

Толлеров показал, что покрытие CanFam3.1 chr15 по сравнению с ранее идентифицированным CNV размером 6 т.п.н. относительное количество копий по сравнению со светло-красными собаками (рис. 2А). Обратите внимание, что эталонный геном показывает две tandemные копии CNV, охватывающие область размером примерно 12 т.п.н. CNV расположен в межгенной области примерно в 152 т.п.н. выше ближайшего гена, KITLG.

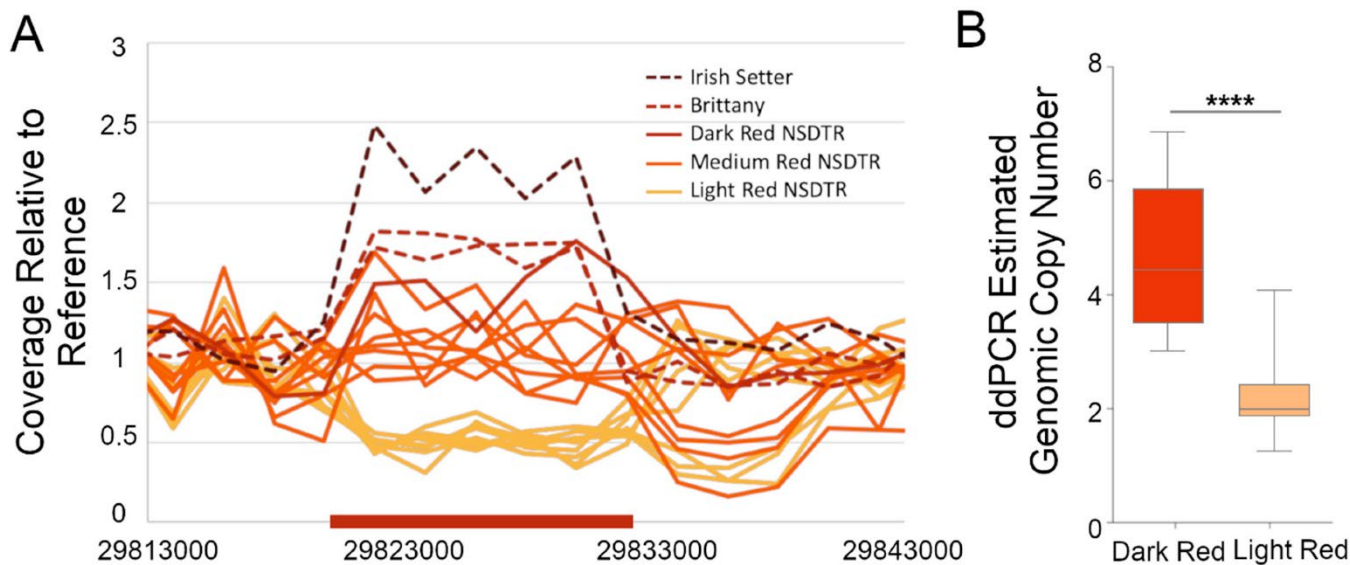


Рисунок 2. Относительное покрытие по региону KITLG CNV.

(А) Относительный охват от секвенирования парных концов полногенома нанесен на ось у, а положение пары оснований CanFam3.1 chr15 отложено на оси х. Область CNV отмечена красной полосой на оси абсцисс. Каждая линия представляет собой отдельную собаку, а цвет линии представляет цвет шерсти этой собаки. Сплошные линии представляют собак породы Толлер, а пунктирные линии представляют Бриттани (*прим. пер.: Бретонский эпаньоль*) и Ирландского сеттера.

(В) Сравнение собак Толлеров со светлыми и темными окрасами с использованием цифровой капельной ПЦР для оценки количества копий. Сравнение с использованием критерия Манна – Уитни.  $p = 4,1 \times 10^{-11}$ . Темно-красный,  $n = 28$ . Светло-красный,  $n = 34$ . \*\*\*\* = очень значимо.

### 3.3. Валидация KITLG CNV в окрасах шерсти на основе феомеланина

Чтобы подтвердить связь высокого числа копий CNV KITLG с темно-красным окрасом шерсти у Толлеров, проверено 28 темно-красных и 342 светло-рыжих окрасов собак, которые были гомозиготные по потере функциональных аллелей MC1R (*прим. пер.: ee*), у них были генотипированы CNV с помощью анализа цифровой капельной ПЦР (ddPCR). Темно-красный Толлер (медиана = 5 геномных копий) имел значительно большее количество копий CNV по сравнению со светло-красным Толлером (медиана = 2 геномные копии,  $p = 4,1 \times 10^{-11}$ ) (рис. 2В). После проверки ассоциации в Толлерах, CNV был затем генотипирован в дополнительных породах с фиксированным темно-красным фенотипом. Ирландские сеттеры ( $n = 48$ ), порода, характеризующаяся интенсивным темно-красным пигментом, имели средний генотип из семи геномных копий. Другая порода с темно-красным пигментом, Бретань ( $n = 4$ ), имела медианный генотип в шесть геномных копий.

Чтобы подтвердить зависимость большого числа копий с темно-красным окрасом, были проведены сравнения белых и красных пуделей (рис. 3А). Сравнение белых пуделей ( $n = 21$ ) с красными пуделями ( $n = 29$ ) показало увеличение количества копий у красных пуделей (медиана = 8 геномных копий) по сравнению с белыми (медиана = 7 геномных копий,  $p = 0,003$ ), однако это не было статистически значимым, тогда белые собаки с гомозиготным генотипом для разбавления феомеланина на уровне MFSD12 (*прим. пер.: ii*) были исключены из анализа (рис. 3В). Двумя другими породами с нефункциональным MC1R (*прим. пер.: ee*), которые демонстрируют вариации интенсивности окраса шерсти, являются Золотистый ретривер (GR) и Лабрадор-ретривер (LR). Вариация их окрасов не объясняется вариантами, идентифицированным в MFSD12 (*прим. пер.: локус I*). Ни одна из этих пород не показала значимой связи с количеством копий и светлым или темным окрасом шерсти (GR,  $p = 0,9977$ , светлый  $n = 8$ , средний  $n = 19$ , темный  $n = 8$ ; LR,  $p =$

0,7377, светлый n = 8. , темный n = 8). Породы и количество собак каждого окраса шерсти показаны в Таблице S1

**Table S1.** Number of dogs genotyped for *KITLG* CNV copy number on ddPCR.

<b>Breed</b>	<b>Color</b>	<b>N on ddPCR</b>
Bearded Collie	Grey and white	5
Border Collie	Black and white	26
Boxer	Any	16
Brittany	Red and white	4
Flat Coated Retriever	Black	20
Golden Retriever	Light Golden	8
Golden Retriever	Medium Golden	19
Golden Retriever	Dark Golden	8
Gordon Setter	Black and tan	6
Irish Setter	Red	48
Labrador Retriever	Light Yellow	8
Labrador Retriever	Dark Yellow	8
Nova Scotia Duck Tolling Retriever	Dark Red	28
Nova Scotia Duck Tolling Retriever	Light Red	34
Old English Sheepdog	Grey and white	7
Poodle	White	21
Poodle	Red	29
Poodle	Black	42
Poodle	Silver	27
Rottweiler	Black and tan	17
Weimaraner	Grey	24
Wolf	Unknown	4

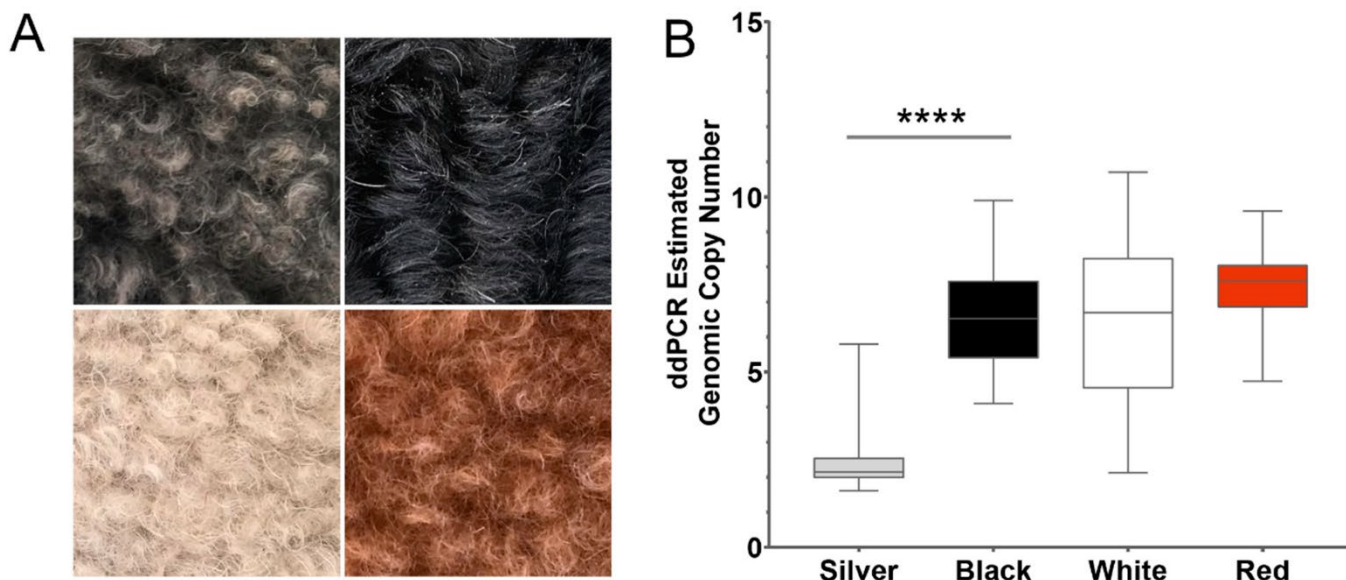


Рисунок 3. Окрас шерсти пуделей на основе эумеланина и феомеланина и количество копий CNV.

(А) Типичные образцы окрасов шерсти пуделя от серебра с низкой интенсивности эумеланина (вверху слева), эумеланина высокой интенсивности черного (вверху справа), крема низкой интенсивности феомеланина (внизу слева) и феомеланина высокой интенсивности красного (внизу справа).

(В) Число копий генома, измеренное с помощью цифровой капельной ПЦР от пуделей высокой и низкой интенсивности с феомеланином и цветами шерсти на основе эумеланина. Серебро по сравнению с черным было значимым ( $p = 1,5 \times 10^{-8}$ ), в то время как белый по сравнению с красным - нет. Количество образцов слева направо следующие:  $n = 27$ ,  $n = 425$ ,  $n = 21$  и  $n = 29$ . \*\*\*\* = высокозначимые.

#### 3.4. Валидация *KITLG* CNV для красок на основе эумеланина

У породы Пудель различия в интенсивности пигмента наблюдаются как в цветах шерсти на основе феомеланина, так и на основе эумеланина (рис. 3А). Цвета на основе эумеланина варьируются от серебристого или светло-серого до черного, и для них были оценены количество копий CNV *KITLG*. У черных пуделей ( $n = 42$ ) было значительно более высокое количество копий (медиана = 6 геномных копий) по сравнению со светло-серыми (медиана = 2 геномные копии,  $n = 27$ ) собаками ( $p = 2,1 \times 10^{-11}$ ) (рис. 3В). Породы, зафиксированные для светло-серого или черного окраса шерсти, также были генотипированы, включая светло-серые породы, такие как Бородатый колли (медиана = 4 геномных копии,  $n = 5$ ) и Староанглийская овчарка (медиана = 2 геномные копии,  $n = 7$ ) и черная порода такая как Бордер-колли (BC, медиана = 3,  $n = 26$ ), Ретривер с гладкой шерстью (FCR, медиана = 7,  $n = 20$ ) и Ротвейлер (медиана = 8,  $n = 17$ ). Кроме того, серые волки с неизвестным окрасом шерсти из Северной Америки ( $n = 2$ ), Азии ( $n = 1$ ), Европы ( $n = 1$ ) и Африки ( $n = 1$ ) были генотипированы, и все они имели очень низкое количество копий (примерно две геномные копии) (рисунок 4).

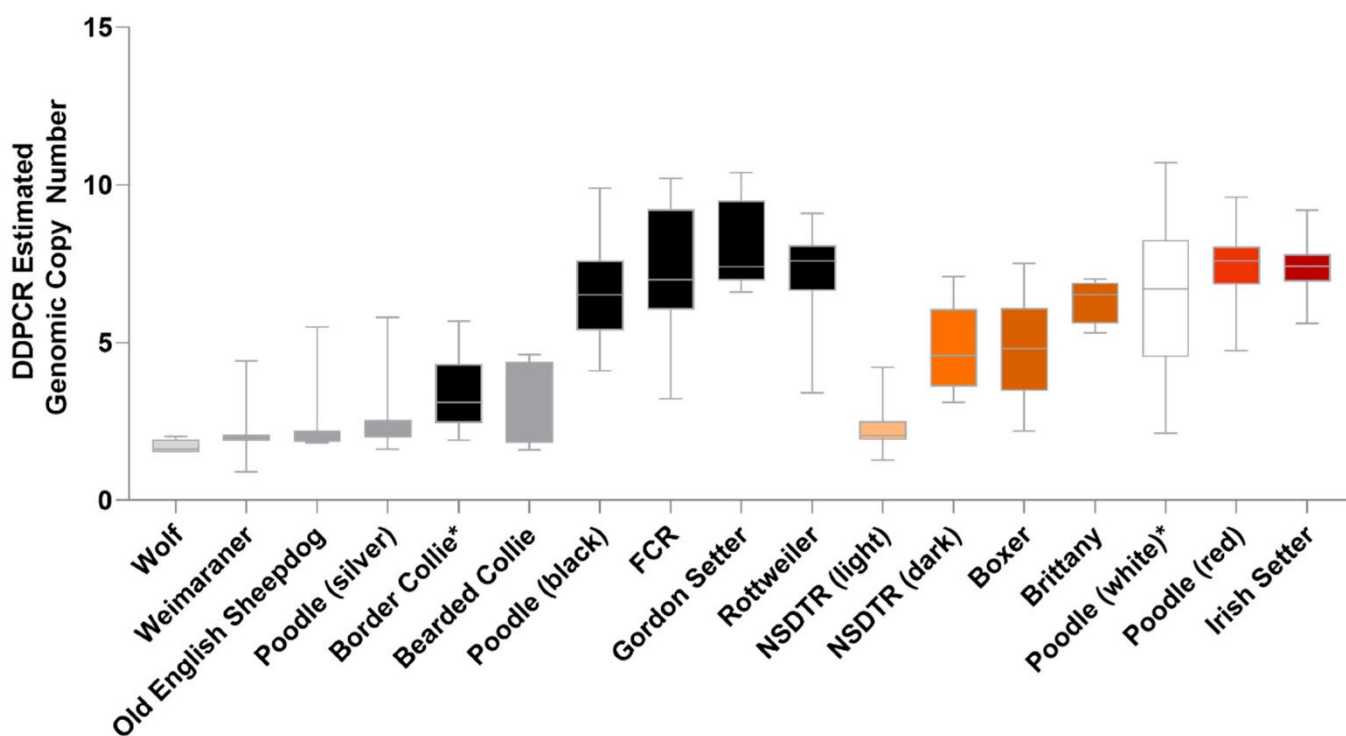


Рис. 4. Исследование числа геномных копий, рассчитанных для некоторых пород собак и волков. Породы, которые, как известно, разделяют по интенсивности окрасов со светлым и тёмным окрасами шерсти на основе эумеланина и / или феомеланина, были разделены по цвету. Породы имеют цветовую кодировку, приближенную к общему окрасу шерсти, а номера образцов приведены в Таблице S1.

\* Породы, количество копий которых не соответствовало окрасу их шерсти.

### 3.5. Сравнение волос шерсти у собак с высоким и низким числом копий

У двух пород собак не было соответствия числа копий с интенсивностью пигментации шерсти. Черно-белый Бордер Колли (BD) не имел большого количества копий, как ожидалось, а белые Пудели имели большее количество копий, чем ожидалось, вероятно, из-за присутствия других мутаций, которые влияют на интенсивность их феомеланина. Пудели, окрасы которых были основаны на эумеланине, действительно имели сильную корреляцию количества копий и цвета. У пуделей есть мутации, которые изменяют длину их волос, что продлевает фазу анагена цикла роста волос. Это привело нас к гипотезе о том, что интенсивность пигмента может быть связана с изменениями распределения пигмента по длине шерсти по сравнению с породами собак с более типичным ростом волоса в фазе анагена. Изменения цвета пигмента вдоль стержня волоса оценивали количественно с использованием фотографий с высоким разрешением и сравнивали с собаками с высоким и низким количеством копий. Собаки с низким числом копий, по-видимому, имеют меньшую пигментацию у корня по сравнению с собаками с высоким числом копий (Рисунок 5А). Линейный регрессионный анализ 15 собак породы Толлер с отношениями интенсивности цвета от корня до кончика и расчётным числом геномных копий ddPCR выявил значительную связь высокого числа копий с низким соотношением ( $p = 0,0022$ ) (рис. 5В). Кроме того, эумеланиновая порода со светлыми корнями (бордер-колли) имела значительно меньшее количество копий по сравнению с FCR равномерно пигментированных гладкошёрстных Ретриверов (FCR) ( $p = 2,3 \times 10^{-7}$ ) (рис. 5С).



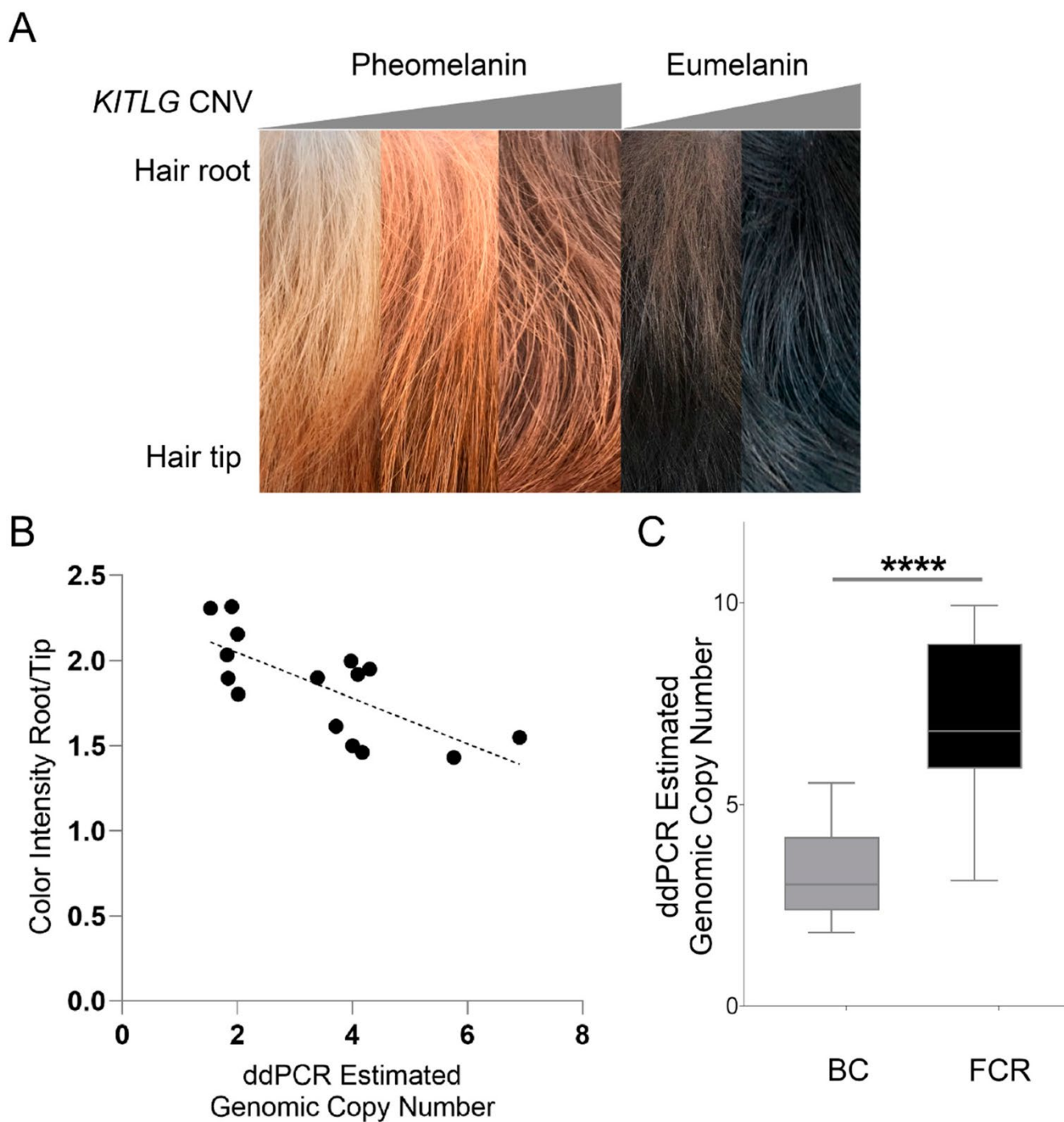


Рисунок 5. Количественный анализ образцов волос у пород на основе феомеланина и эумеланина.

(A) Образцы шерсти (слева направо) собак с низким, средним и высоким числом копий породы Толлер, а также с низким и высоким числом копий собак на основе эумеланина (Бордер колли (BC) и гладкошерстный Ретривер (FCR)).

(B) Анализ линейной регрессии выявил значительную связь между увеличением количества копий и более низким соотношением интенсивности цвета между корнем и кончиком волос в NSDTR ( $r^2 = 0,525$ ,  $p = 0,0022$ ,  $n = 15$ ). (C) FCR ( $n = 20$ ) имеют значительно более высокое количество копий по сравнению с BC ( $n = 26$ ) в анализе ddPCR ( $p = 3,9 \times 10^{-9}$ ). Цвет графика представляет собой приблизительный цвет волос у корня волоса.

\*\*\*\* = очень важно.

#### 4. Обсуждение

Выделение область на CFA 15 связанную с интенсивностью феомеланина у Толлеров позволило, связать её с интенсивностью пигмента шерсти у собак. Анализ вариантов выявил CNV в 6 т.п.н. выше KITLG, что было тесно связано с интенсивностью феомеланина у собак породы Толлер ( $p < 0,0001$ ) и у других пород. Число копий CNV в значительной степени связано с интенсивностью эумеланина у пуделей и разных пород и, в меньшей степени, с феомеланином. У всех протестированных волков было две копии этого элемента, что указывает на то, что хромосомы с более высоким числом копий и высокой интенсивностью пигмента

представляют собой производное состояние. Интенсивность пигмента обусловлена различным распределением пигмента вдоль стержня волоса: особи с низким числом копий имеют более светлые волосы у корня, в то время как более интенсивно пигментированные особи не имеют разницы в интенсивности пигмента от корня до кончика волоса. У породы пудель шерсть постоянно растёт, по этой причине разница в цвете, связанная с разными аллелями CNV, особенно заметна.

Ранее было показано, что KITLG и его рецептор, KIT, участвуют в гемопоэзе (*прим. пер: Гемопоэз – это процесс образования форменных элементов крови*), меланогенезе (*прим. пер: Меланогенез – это процесс образования меланина*) и гаметогенезе (*прим. пер: Гаметогенез или предзародышевое развитие — процесс образования половых клеток, или гамет*). Плейотропные эффекты генов (*прим. пер: Плейотропия — явление множественного действия гена. Выражается в способности одного гена влиять на несколько фенотипических признаков.*), ответственных за изменение окрасов шерсти, обычны у млекопитающих. В этом случае эта пара рецепторов лиганда необходима для миграции и пролиферации популяций стволовых клеток во время развития. Эти популяции стволовых клеток включают первичные половые клетки, гематopoэтические клетки-предшественники и меланобласты. Помимо этой функции раннего развития при миграции меланобластов, KITLG важен для постнатального кожного меланогенеза. В частности, экспрессия KITLG важна в эпителиальных клетках волосяных фолликулов для терминальной дифференцировки меланоцитов. Существенная роль, которую KITLG играет в меланогенезе, как в процессе развития, так и в стержне волоса, согласуется с его идентификацией в качестве локуса интенсивности пигментации у собак.

Варианты KITLG и его рецептора KIT вызывают изменения пигментации у человека. Было показано, варианты кодирующей последовательности в KITLG вызывают семейную прогрессирующую гиперпигментацию с гипопигментацией или без неё, а также синдром Ваарденбурга типа 2 (с пигментными аномалиями). Кроме того, варианты кодирования рецептора KIT были связаны с классическим аутосомно-доминантным заболеванием пьебальдизм, характеризующимся врождёнными участками кожи без присутствия меланоцитов. Однако было показано, что регуляторные варианты влияют на интенсивность пигментации. Sulem et al в 2007 обнаружили, что гены выше KITLG были связаны с цветом волос при сканировании ассоциации по всему геному у исландцев и голландцев. Этот вариант, вероятно, лежит в неравновесном сцеплении, с расширенным гаплотипом выше KITLG, демонстрирующим сильную сигнатуру отбора у людей. Guenther et al в 2014 обнаружили, что эта область управляет экспрессией исключительно в волосяных фолликулах, используя репортерные конструкции у мышей. KITLG выполняет различные важные функции развития; однако изменение экспрессии влияет только на волосяные фолликулы и может быть средством ограничения эффектов фенотипами пигментации.

Было установлено, что регуляторные варианты KITLG (или Kitl у мышей) вызывают различия в пигментах у других видов животных. Первоначальные мутации у мышей, связанные с Kitl, были названы стальными из-за их равномерно разбавленной окраски шерсти. Аллель у серой панды вызван инверсией, которая нарушает вышестоящую регуляторную область Kitl, что также приводит к ослаблению пигментации. И у коз, и у норок экспрессия KITLG ниже у светлых животных по сравнению с более тёмно пигментированными животными. В этой работе уровни экспрессии KITLG не оценивались из-за проблем с получением образцов кожи от здоровых домашних собак; однако, основываясь на работе, проделанной на других видах, CNV, вероятно, изменяет уровни экспрессии KITLG в волосяном фолликуле.

В то время как у многих протестированных пород собак интенсивность пигментации зависела от CNV KITLG, некоторые породы с вариацией феомеланина не зависела от CNV KITLG. Примечательно, что у Золотистых ретриверов и Лабрадоров была изменчивость по CNV, но она не коррелировала с окрасом их шерсти, что указывает на то, что у собак все ещё существуют дополнительные неисследованные локусы или варианты, которые влияют на интенсивность пигментации. Кроме того, у белых пуделей, вероятно, есть несколько генов, включая CNV KITLG и MFSD12, участвующих в формировании их фенотипа. Неудивительно, что многие локусы влияют на пигментацию, поскольку собаки подвергаются столь сильному искусственному отбору и имеют такое разнообразие окрасов шерсти.

CNV KITLG ранее связывали с предрасположенностью к плоскоклеточной карцине пальцев (DSCC) у собак с интенсивным окрасом. Анализ был проведён на случаях DSCC с интенсивным пигментом и контрольной

группы собак, и большое количество копий CNV было идентифицировано как локус предрасположенности; однако этот эффект был обнаружен только в случаях эумеланизма с функциональным MC1R (*прим.пер.: E-*). С вариациями локуса KITLG связывают в развитие меланомы, рака яичек, колоректального рака и общего риска рака у людей. В случае риска развития DSCC у собак в аллели имелось больше четырёх копий CNV, и у гомозиготных животных вероятность наличия DSCC была выше. У собак с черным окрасом чаще были случаи DSCC, так как 92% образцов были взяты именно от собак с черной пигментацией. Однако есть породы, такие как гладкошёрстный Ретриверы с высоким числом копий, черной шерстью и собаки этой породы не предрасположены к этому типу опухолей. Возможно, что высокое количество копий CNV в KITLG является ещё одним дополнительным фактором риска для пород, которые более восприимчивы к этому типу опухолей. Так же можно предположить, что некоторые черные собаки с высоким числом копий CNV в KITLG также могут иметь защитные аллели.

Варианты человеческого KITLG, влияющие на цвет волос, расположены в области, аналогичной CNV, идентифицированной у собак. Копии CNV на 86,1% идентичны человеческой последовательности. Человеческая гомологичная область CNV как и у собак расположена на 200 т.п.н. выше человеческого KITLG. Самая сильная селективная сигнатура для KITLG у человека расположена на 218 т.п.н. выше кодирующей последовательности, в то время как SNV, связанные со светлой пигментацией, расположены на 355 т.п.н. выше KITLG. Изменения KITLG у собак произошли под давлением искусственного отбора, это одна из 20 областей генома, в которых наблюдаются изменения, связанные с селекцией у домашних собак. Интересно, что люди у собак выбирают более интенсивную пигментацию по сравнению с волками с окрасом дикого типа. Яркая и насыщенная пигментация домашних собак - это один из способов отличить их от волков. У волков есть только одна копия этой области размером 6 т.п.н., что указывает на то, что амплификация области произошла у домашних собак. (*прим.пер.: Амплификация в молекулярной биологии — процесс образования дополнительных копий участков хромосомной ДНК.*) Можно предположить, что это могло быть одним из полезных способов отличить прото-собак партнёров человека от их диких предков.

## 5. Выводы

KITLG CNV связан с интенсивностью пигмента шерсти домашних собак. Увеличение количества копий связано с более темным, более интенсивным окрасом шерсти и более равномерной интенсивностью пигмента по стержню волос у многих пород. Волки не обнаруживают вариаций числа копий в этом локусе, и предыдущие полногеномные скрининги идентифицировали область CNV KITLG как зависящую от искусственного отбора у домашних собак. KITLG играет важную роль в меланогенезе как в развитии, так и во взрослом волосяном фолликуле, а генетические варианты выше KITLG как у мышей, так и у людей связаны с изменением цвета шерсти и волос. Это исследование предполагает, что KITLG CNV является новым локусом интенсивности окраса у домашних собак.