

КОРРЕЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ PRM1, STK35 И IFT27 С ПОКАЗАТЕЛЯМИ КАЧЕСТВА СЕМЕНИ БЫКОВ ГОЛШТИНСКОЙ ПОРОДЫ***О. Ю. Баркова¹**, кандидат биологических наук, **Д. А. Старикова¹**, кандидат биологических наук, **И. В. Чистякова¹**, кандидат биологических наук*Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных, филиал Федерального научного центра животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста, 196601, Пушкин, Московское ш., 55 А
e-mail: barkoffws@list.ru*

Исследования проводили с целью корреляционного анализ между уровнем экспрессии мРНК генов PRM1, STK35 и IFT27 и показателями качества нативной и декриоконсервированной спермы быков голштинской породы для поиска эффективных транскриптомных биомаркеров семени быков. В ходе исследования использованы нативная и декриоконсервированная сперма семи быков голштинской породы. Для решения задач исследования изучали восемь показателей качества спермы, проводили анализ экспрессии изучаемых генов в нативных и декриоконсервированных сперматозоидах в реальном времени. При обработке результатов применяли непараметрические вероятностно-статистические методы, анализ ранговой корреляции проводили с использованием критерия Спирмена. Более высокую экспрессию изучаемых генов преимущественно отмечали в замороженно-оттаянной сперме, по сравнению с нативной. Между уровнем экспрессии мРНК гена протамина (PRM1) и показателями качества спермы достоверной корреляции не установлено. Уровень экспрессии мРНК гена IFT27 достоверно положительно коррелировал с содержанием дефектных клеток из замороженно-оттаянной спермы (0,714, $p=0,05$) и мертвых клеток (0,714, $p=0,0545$) из нативной спермы. Отрицательная связь отмечена с концентрацией нормальных клеток в замороженно-оттаянной сперме (-0,750, $p=0,038$) и живых клеток (-0,714, $p=0,0545$) в нативной сперме. Транскрипт (мРНК) гена IFT27 отрицательно коррелировал (-0,703, $p=0,0545$) с показателем дефекта акросомы замороженно-оттаянных сперматозоидов. Содержание активных форм кислорода (АФК) достоверно коррелировало (0,786, $p=0,0251$) с мРНК гена IFT27. Транскрипт (мРНК) гена STK35 был единственным из всех исследуемых мРНК, который имел среднюю отрицательную корреляцию с показателем подвижности сперматозоидов в нативной (-0,692, $p=0,052$) и замороженно-оттаянной сперме (-0,876, $p=0,035$). Результаты этих исследований могут быть использованы для создания системы неинвазивных транскрипционных маркеров качества спермы быков.

CORRELATION ANALYSIS OF THE PRM1, STK35 AND IFT27 LEVEL OF EXPRESSION GENES WITH THE QUALITY OF NATIVE AND DEPOSITED SEED OF HOLSTING BULLS**Barkova O.Yu., Starikova D. A., Chistyakova I. V.***Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding – Branch of the L. K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, 196601, Pushkin, Moskovskoe sh., 55 A
e-mail- barkoffws@list.ru.*

The research aim is a correlation analysis of the PRM1, STK35 and IFT27 genes mRNA expression with the native and decryoconserved sperm quality indicators of Holstein bulls to search for effective transcriptomic biomarkers of bull semen. In the study course, native and decryoconserved sperm of seven Holstein bulls were used. To solve the study problems, eight indicators of sperm quality were studied, the studied genes in native and decryoconserved spermatozoa expression was analyzed in real time PCR. Nonparametric probabilistic and statistical methods were used, the analysis of rank correlation was carried out using Spearman's criterion. Higher expression of the studied genes was mainly noted in frozen-thawed sperm compared to native. The mRNA expression level of the protamine gene (PRM1) did not give a reliable correlation with sperm parameters: The level IFT27 gene mRNA expression was significantly positively correlated with the content of defective cells from frozen-thawed sperm (0.714, $p=0.05$) and dead cells (0.714, $p=0.0545$) from native sperm. A negative correlation was noted with the content of normal cells in frozen-thawed sperm (-0.750, $p=0.038$) and live cells (-0.714, $p=0.0545$) in native sperm. The IFT27 gene transcript (mRNA) showed a negative correlation (-0.703, $p=0.0545$) in terms of the acrosome defect of frozen-thawed spermatozoa. In terms of the content of reactive oxygen species (ROS), the mRNA of the IFT27 gene had a significant positive correlation (0.786, $p=0.0251$). The STK35 gene transcript (mRNA) was the only one of all the studied mRNAs that had an average negative correlation with sperm motility in native (-0.692, $p=0.052$) and frozen-thawed sperm (-0.876, $p=0.035$). These studies can be used to create a system of non-invasive transcriptional markers of bull sperm quality.

Ключевые слова: сперматозоиды, быки, качество семени, криоконсервация, мРНК, транскрипты, биомаркеры криорезистентности, митохондрии, PRM1, STK35, IFT27.

Key words: spermatozoa, bulls, semen quality, cryopreservation, RNA, transcripts, cryoresistance biomarkers, mitochondria, PRM1, STK35, IFT27.

Несмотря на совершенствование сред и протоколов процедуры криоконсервации, значительное число спермиев гибнет после процедур заморозки/оттаивания семени [1]. Относительно новый подход к использованию омиксных технологий в репродуктивной криоби-

ологии позволил выявить гены, транскрипты и белки, связанные с оплодотворяющей способностью и криорезистентностью сперматозоидов, но объем данных о РНК-профайлах, ассоциированных с устойчивостью к заморозке-оттаиванию весьма ограничен [2]. Транс-

*работа выполнена в рамках работ по гранту Российского Фонда Науки № 22-76-10041.

криптом в сперматозоиде ассоциирован с фертильностью, а также участвует в оплодотворении и раннем развитии эмбриона [3, 4, 5]. Сведения о ассоциациях транскриптома с качеством сперматозоидов могут быть использованы для создания эффективной неинвазивной системы биомаркеров. С применением методики полногеномного секвенирования РНК (RNA-Seq) в замороженных-оттаянных сперматозоидах быков были идентифицированы транскрипты таких потенциально оказывающих влияние на оплодотворяющие свойства спермы генов, как PRM1, STK35, и IFT27. Протамин-1 (PRM1) экспрессируется в клетках спермы и относится к распространённым основным белкам, содержащимися в головке сперматозоида. Он важен для защиты генома самца от повреждений во время и после упаковки нитей ДНК с помощью гистонов [6]. Аномальная структура протаминов приводит к бесплодию или ухудшению репродуктивных результатов из-за снижения количества, подвижности и жизнеспособности сперматозоидов [7]. Серин-треонинкиназа 35 (STK35), также известная как CLK1 и STK35L1, – новая киназа, компонент комплексов ремоделирования хроматина и, следовательно, может напрямую влиять на основную механизм транскрипции и экспрессии генов [8]. STK35 регулирует такие функции, как миграция, пролиферация, выживание и ангиогенез клеток. Он характеризуется высоким уровнем экспрессии в семенниках. Существует предположение, что локализованный в ядре белок импортин- α 2 (IMP- α 2) участвует в регуляции транскрипции STK35 во время сперматогенеза [9]. Среди генов IFT особый интерес представляет компонент внутрижгутикового транспортного комплекса IFT27 (RABL4), который играет критическую роль в подвижности и метаболизме сперматозоидов и в высокой степени экспрессируется в семенниках. Комплекс IFT25/IFT27 принимает участие в сборке структуры ядра аксономы сперматозоидов [10]. Результаты предыдущих исследований подтвердили, что однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) в промоторах генов STK35 и IFT27, экспрессируемых в сперматозоидах хряков, влияют на транскрипционную активность генов и связаны с плохой замораживаемостью эякулятов и смертность эмбрионов [11].

Цель исследований – корреляционный анализ экспрессии генов PRM1, STK35 и IFT27 с показателями качества нативной и декриоконсервированной спермы быков голштинской породы для поиска эффективных транскриптомных биомаркеров семени быков.

Методика. Исследования проводили на базе АО «Невское» на 7 быках голштинской породы в возрасте от 1 года до 3 лет. Всего было исследовано 7 проб нативной и 7 проб декриоконсервированной спермы по 3 пайеты с дозой спермы объемом 0,5 мл в каждой. Объем каждой пробы нативной спермы составлял 1000...1500 мкл, концентрация варьировала от 0,7 до 1,65 млрд клеток/мл. Стандартную процедуру криоконсервации спермы проводили на АО «Невское» с использованием разбавителем OptiXcell (IMV technologies, Франция) в соотношении 1:1. Концентрация клеток в пайете достигала $4...9 \times 10^6$ клеток /мл. Подвижность и концентрацию половых клеток свежего эякулята оценивали с использованием ка-

меры Маклера (Sefi Medical Instrument, Италия). Перед проведением экспериментов свежий эякулят разбавляли в среде HBSS (Hank's Balanced Salt Solution), доводя до объема 500 мкл, так чтобы итоговая концентрация клеток не превышала $2...4 \times 10^6$ клеток/мл. Концентрацию клеток проверяли на фотометре SDM 1 (Minitube, Германия). Затем клетки дважды осаждали путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 10 минут и 37°C , супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 1,5 мл среды HBSS. После этого образцы использовали для получения РНК, оценки морфологии клеток, анализа биохимических показателей мужских гамет. До выделения РНК образцы спермы очищали от соматических и мертвых клеток путем градиентного центрифугирования с использованием раствора Фиколла [12]. Анализ морфологии сперматозоидов проводили под иммерсией на световом микроскопе Olympus Vanox-t (Япония) после окрашивания мазка эякулята с помощью тест набора Дифф-Квик (АБРИС+ НПФ, РОССИЯ), согласно рекомендациям производителя. На каждом суховоздушном препарате наблюдали по 200 сперматозоидов. Для оценки мембранного потенциала митохондрий клетки сперматозоидов окрашивали флуоресцентным липофильным карбоцианиновым красителем JC-1. Оценку жизнеспособности и целостности клеточных мембран сперматозоидов осуществляли путем окрашивания интеркалирующими красителями: пропиридиумом йодидом, контрастного красителя для ядер и хромосом, окрашивающего мертвые клетки, и SYBR Green I, специфичного к двухцепочечной ДНК. Уровень генерации активных форм кислорода в нативных и деконсервированных сперматозоидах оценивали путем окраски спермы красителем H2DCFDA (2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат). Анализ целостности мембран, жизнеспособности, мембранного потенциала митохондрий и уровня генерации активных форм кислорода проводили с использованием проточного цитометра CytoFLEX, BeckmanCoulter (США). Прибор был настроен на низкую скорость сбора данных проточной цитометрии с максимальное разрешение. Результаты анализировали с помощью программы CytExpert 2.4.

РНК из нативной и деконсервированной спермы предварительно отмытой средой HBSS и реагентом Фиколл выделяли с использованием набора ExtractRNA (Евроген) тщательно следуя указаниям производителя. Полученные образцы РНК обрабатывали термолабильной ДНКазой EM 100 (Биолабмикс) в соответствии с рекомендацией производителя. Концентрация РНК, измеренная на спектрофотометра NanoDrop ND-1000, находилась в диапазоне от 500 до 1000 нг/мл. Дизайн олигонуклеотидов-праймеров для анализа экспрессии последовательности генов-кандидатов, влияющих на качество спермы, проводили на основании информации из баз данных сети интернет (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> и www.ensembl.org) с использованием компьютерной программы PRIMER_3 (www.genome.wi.mit.edu). Синтез однострессовой кДНК осуществляли при помощи обратной транскриптазы Mint (Евроген), следуя указаниям производителя. Реакцию выполняли в объеме 20 мкл. Анализ экспрессии РНК из нативной и замороженно-оттаянной спермы быков про-

Табл. 1. Последовательность олигонуклеотидов-праймеров генов-кандидатов ассоциированных с качеством сперматозоидов

Название гена	Последовательность праймера и температура отжига ($^\circ\text{C}$)		Размер продукта, п.н.
	прямой	обратный	
PRM1	ATGGCCAGATACCGATGCTG, 59,96	ACCTCTTCACSTCTCCTCC, 59,96	123
STK35	GTGGAGACSTCGCTCAAAGG, 60,39	GGAAAGGAGGGTGTGTCCG, 60,00	152
IFT27	GACAACAGGGGTGGATCTGG, 60,00	TCTCCAGAGTGGAGGACAG, 60,00	153
SLC2A5 (GLUT5)	TGACCTACCACCAACCCTGA, 60,10	CATGCCTGTGGCTACCAGAA, 60,04	194
GAPDH	CCGCAAGGAGAACTCAAGGT, 59,96	CGGCCAAGCAAAAATTGGA, 59,97	163

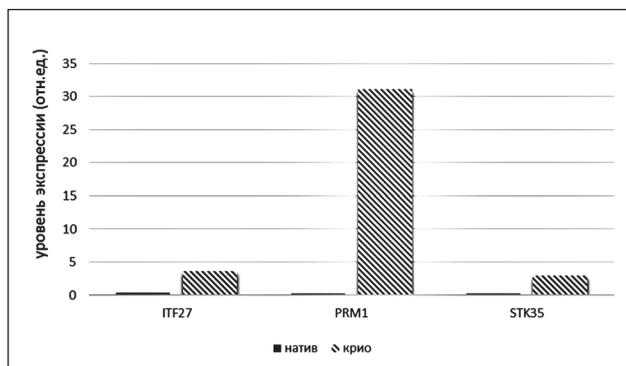


Рис. 1. Изменение уровня экспрессии генов-кандидатов в нативных и декриоконсервированных сперматозоидах.

водили с использованием олигонуклеотидов-праймеров (табл. 1).

Далее осуществляли амплификацию смеси однонитевой кДНК с использованием 5х реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR (Евроген), предназначенной для ПЦР в реальном времени, с интеркалирующим красителем SYBR Green I в соответствии с рекомендациями производителя. Реакции выполняли на амплификаторе в реальном времени CFX96 Touch (Bio-Rad, США) в следующем режиме: амплификация кДНК и детекция сигнала (40 циклов): 95 °С – 5 мин; 95 °С – 15 с; 59 °С – 15 с; 72 °С – 20 с (этап сбора данных). Реакции ОТ-ПЦР в реальном времени для каждого образца проводили в трех повторениях. В дальнейшем использовали среднее арифметическое значение. Расчет изменения экспрессии отдельных молекул микроРНК выполняли методом –2dCt (delta cycle threshold) [13]. Статистическую значимость различий исследуемых параметров между группами оценивали методами непараметрического однофакторного анализа ANOVA по Kruskal-Wallis и Holm-Sidak, анализ ранговой корреляции проводили с использованием критерия Спирмена в программе SigmaPlot 14. Все эксперименты проводили с одобрения комиссии по этике Российской научно-исследовательского института генетики и селекции сельскохозяйственных животных – филиала ФГБНУ Федерального научного центра животноводства имени Л. К. Эрнста (протокол от 03.03.2020 № 2020–4).

Всего было отобрано 3 гена-кандидата, влияющих на криорезистентность и оплодотворяющие качества спермы: кодирующие белки протамина 1 (PRM1), серин/треонинкиназы 35 (STK35) и компонент внутрижутикового транспортного комплекса (IFT27). Для измерения уровня экспрессии в качестве референсных генов использовали SLC2A5 (GLUT5) и GAPDH (см. табл. 1), которые

имеют относительно постоянный уровень экспрессии практически во всех тканях и клетках.

Результаты и обсуждение. Экспрессия изучаемых генов в замороженно-оттаянной сперме была преимущественно выше, чем в нативной (рис. 1). Статистически значимые различия между ее уровнями были отмечены для генов IFT27 (p=0,04) и PRM1 (p=0,02).

Ген IFT27 оказывал отрицательное влияние на продуктивные качества спермы. Его транскрипт (мРНК) характеризовался достоверной положительной корреляцией с содержанием дефектных клеток в замороженно-оттаянной сперме и мертвых клеток в нативной сперме (табл. 2). В то же время отмечена отрицательная связь с содержанием нормальных клеток в замороженно-оттаянной сперме и живых клеток в нативной сперме. У транскрипта гена IFT27 установлена отрицательная корреляция с величиной показателя дефекта акросомы у замороженно-оттаянных сперматозоидов, и достоверная положительная с содержанием активных форм кислорода (АФК). При этом известно, что образование АФК – одна из основных причин повреждения сперматозоидов при криоконсервации, что в свою очередь, снижает их подвижность, жизнеспособность и другие параметры качества после оттаивания.

Ген STK35 был единственным из всех исследуемых, который имел среднюю отрицательную корреляцию с показателем подвижности в образцах нативной и замороженно-оттаянной спермы. Других достоверных связей уровня экспрессии гена STK35 с признаками сперматозоидов не выявлено (см. табл. 2).

Результаты наших исследований отчасти подтверждаются данными польских ученых [11], согласно которым экспрессия генов серин/треонинкиназы 35 (STK35) и внутрижутикового транспорта 27 (IFT27), обнаруженная с использованием пакета Bioconductor (DESeq), повышалась в эякулятах хряков с плохой криорезистентностью.

Достоверная связь между уровнем экспрессии протамина (PRM1) и показателями спермы не установлена.

Выводы. На основе полученных данных можно сделать предположение, что транскрипты генов (мРНК) серин/треонинкиназы 35 (STK35) и компонент внутрижутикового транспортного комплекса (IFT27) могут быть использованы как биомаркеры, позволяющие быстро и неинвазивно выявлять причины низкой устойчивости конкретных проб к заморозке-оттаиванию. Повышение экспрессии этих генов негативно сказывается на качестве сперматозоидов. Пополнение фундаментальных знаний о связи конкретных механизмов низкой криорезистентности с определенными транскриптами позволит выработать возможные способы решения проблемы.

Табл. 2. Анализ корреляционных связей уровня относительной экспрессии исследуемых генов с некоторыми показателями качества спермы быков

Признак сперматозоидов	Состояние спермы	PRM1		IFT27		STK35	
		R, Spearman	p-value	R, Spearman	p-value	R, Spearman	p-value
Подвижность	нативное	0,342	0,297	-0,168	0,660	-0,692	0,052
	деконсервированное	-0,617	0,121	-0,243	0,545	-0,876	0,035
Дефектные	нативное	0,015	0,968	0,600	0,350	0,321	0,438
	деконсервированное	0,357	0,380	0,714	0,054	0,500	0,217
Норма	нативное	0,015	0,968	0,107	0,781	-0,321	0,438
	деконсервированное	-0,536	0,181	-0,750	0,038	-0,571	0,150
Дефект акросомы	нативное	0,037	0,905	0,000	0,968	0,185	0,660
	деконсервированное	-0,054	0,843	-0,703	0,054	0,450	0,255
Мертвые SYBR/PI	нативное	-0,643	0,096	0,714	0,054	0,393	0,341
	деконсервированное	0,491	0,217	0,600	0,121	0,179	0,660
Живые YBR/PI	нативное	0,643	0,096	-0,714	0,054	-0,393	0,341
	деконсервированное	0,321	0,438	0,321	0,438	0,536	0,181
Степень поляризации митохондриальных мембран, n (%) (JC-1)	нативное	0,071	0,843	0,036	0,905	-0,179	0,660
	деконсервированное	0,000	0,968	0,571	0,150	0,071	0,843
Содержание АФК (DFC)	нативное	-0,200	0,714	0,200	0,714	-0,600	0,242
	деконсервированное	-0,500	0,217	0,786	0,025	-0,500	0,217

Литература

1. *Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization* / L. G. Grötter, L. Cattaneo, P. E. Marini, et al. // *Reprod Domest Anim.* 2019. Vol. 54. No. 4. P. 655–665. doi: 10.1111/rda.13409.
2. Khan M. Z., Sathanawongs A., Zhang Y. *Impact of cryopreservation on spermatozoa freeze-thawed traits and relevance OMICS to assess sperm cryo-tolerance in farm animals.* // *Front Vet Sci.* 2021. Vol. 8. 609180. URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2021.609180> (дата обращения: 14.09.2023). doi: 10.3389/fvets.2021.609180.
3. *The presence, role and clinical use of spermatozoal RNAs* / M. Jodar, S. Selvaraju, E. Sendler, et al. // *Hum Reprod Update.* 2013. Vol. 19. No. 6. P. 604–24. doi: 10.1093/humupd/dmt031.
4. *Integrated analysis of mRNAs and long noncoding RNAs in the semen from Holstein bulls with high and low sperm motility.* / X. Wang, C. Yang, F. Guo, et al. // *Sci Rep.* 2019. Vol. 9. 2092. URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-38462-x> (дата обращения: 14.09.2023). doi: 10.1038/s41598-018-38462-x.
5. *Transcriptome analysis of boar spermatozoa with different freezability using RNA-Seq.* / L. Fraser, P. Brym, C. S. Pareek, et al. // *Theriogenology.* 2020. Vol. 142. P. 400–413. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.11.001.
6. *Nucleotide variability of protamine genes influencing bull sperm motility variables* / Y. M. H, S. Kumar, R. Chaudhary, et al. // *Anim Reprod Sci.* 2018. Vol. 193. P. 126–139. doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.04.060.
7. *Orchestrating the expression levels of sperm mRNAs reveals CCDC174 as an important determinant of semen quality and bull fertility* / S. Selvaraju, D. Swathi, L. Ramya, et al. // *Syst Biol Reprod Med.* 2021. Vol. 67. No. 1. P. 89–101. doi: 10.1080/19396368.2020.1836286.
8. *The STK35 locus contributes to normal gametogenesis and encodes a lncRNA responsive to oxidative stress.* / Y. Miyamoto, P. A. F. Whaley, H. Y. Goh, et al. // *Biol Open.* 2018. Vol. 7. No. 8. P. 26–31. doi: 10.1242/bio.032631.
9. *Importin alpha mRNAs have distinct expression profiles during spermatogenesis* / C. A. Hogarth, S. Calanni, D. A. Jans, et al. // *Dev Dyn.* 2006. Vol. 5. No. 1. P. 253–262. doi: 10.1002/dvdy.20569.
10. *Intraflagellar transporter protein (IFT27), an IFT25 binding partner, is essential for male fertility and spermiogenesis in mice.* / Y. Zhang, H. Liu, W. Li, et al. // *Dev Biol.* 2017. Vol. 432. No. 1. P. 125–139. doi: 10.1016/j.ydbio.2017.09.023.
11. *Promoter polymorphisms in STK35 and IFT27 genes and their associations with boar sperm freezability* / A. Mańkowska, P. Brym, P. Sobiech et al. // *Theriogenology.* 2022. Vol. 189. P. 199–208. doi: 10.1016/j.theriogenology.2022.06.023.
12. *Ficoll-400 density gradient method as an effective sperm preparation technique for assisted reproductive techniques* / H. N. Highland, A. S. Rishika, S. S. Almira, et al. // *J Hum Reprod Sci.* 2016. Vol. 9. No. 3. P. 194–199. doi: 10.4103/0974-1208.192070.
13. *Livak K. J., Schmittgen T. D. Analysis of relative gene expression data Using realtime quantitative PCR and the 2(Delta DELta C(T)) method* // *Methods.* 2001. Vol. 25. No. 4. P. 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.

Поступила в редакцию 31.08.2023
После доработки 08.10.2023
Принята к публикации 24.10.2023