

Анализ связи мононуклеотидной замены (SNP) в регуляторной области гена PPARG с признаками «масса» и «содержание абдоминального жира» у кур

Т.А. Ларкина, аспирантка, **В.П. Терлецкий**, д.б.н., профессор, ФГБНУ ВНИИГРЖ

Отложение излишнего количества жира в организме давно привлекает внимание учёных как в отношении проблемы ожирения у человека, так и с точки зрения продуктивности сельскохозяйственных животных и птиц. Общие усилия исследователей во всём мире направлены на изучение факторов, участвующих в депонировании жира, и разработку методик, позволяющих контролировать этот процесс.

На сегодняшний день единственным приемлемым способом уменьшения накопления жира у бройлеров является создание селекционных программ, направленных на оптимизацию обмена липидов. Чтобы определить факторы, оказывающие влияние на этот процесс, необходимо провести исследования комплекса генов, вовлечённых в депонирование жира у кур. Влияние генов на депонирование жира можно установить, лишь поняв их физиологические и биохимические функции.

Основываясь на функциональных характеристиках генов, связанных с похожими признаками у других животных (различные формы ожирения у человека и лабораторных грызунов, толщина шпига у свиней), мы отобрали 9 генов, являющихся функциональными кандидатами массы абдоминального жира, – FABP1, FABP2, FABP3, HMGA1, MC4R, PPARG, PPARGC1A, POMC и RPTN1.

Материалы и методы исследования. В работе использованы бройлеры обоих полов кросса Иза экспериментального хозяйства ФГБНУ ВНИИГРЖ и фермерского хозяйства.

Были применены следующие методы исследования:

1. Дизайн олигонуклеотидных праймеров с помощью on-line программы Primer3.

2. Выделение тотальной матричной РНК из абдоминальной жировой ткани, головного мозга, печени, толстого кишечника, мышц от 10 особей бройлеров кросса Иза с высоким уровнем абдоминального жира и 10 особей с низким уровнем.

3. Определение профиля экспрессии генов-кандидатов в пяти тканях с помощью количественной ПЦР.

4. Секвенирование фрагментов ДНК.

5. Выделение геномной ДНК для генотипирования 150 особей бройлеров кросса Иза.

6. Анализ частот встречаемости аллелей выявленного полиморфного сайта гена PPARG в группе кур с высоким и низким содержанием абдоминального жира.

7. Статистическая обработка полученных данных.

Результаты исследования. С использованием метода ПЦР в реальном времени был исследован уровень экспрессии 9 функциональных генов-кандидатов, оказывающих влияние на массу и содержание абдоминального жира, в жировой ткани, печени, кишечнике, мышцах, гипофизе и головном мозге бройлеров.

Дизайн геноспецифических олигонуклеотидов-праймеров для генов FABP1, FABP2, FABP3, HMGA1, MC4R, PPARG, PPARGC1A, POMC и RPTN1 проводили на основании информации баз данных сети Интернет с помощью компьютерной программы PRIMER_3.

Не было выявлено достоверных различий в уровне экспрессии генов FABP1 и PPARGC1A в печени, FABP2 и RPTN1 в кишечнике, MC4R и RPTN1 в мозге, FABP3 в скелетных мышцах, PPARG в жировой ткани и POMC в гипофизе бройлеров, различающихся по содержанию и массе абдоминального жира. Корреляция уровня экспрессии этих генов с изучаемыми признаками также была незначительной (табл. 1).

1. Профилирование экспрессии генов-кандидатов для признака «отложение абдоминального жира» у бройлеров

Локус / ткань	Отношение средних значений уровня экспрессии жирные/нежирные	Корреляция	
		с массой абдоминального жира	с содержанием абдоминального жира
FABP1 / печень	0,99	-0,04	-0,01
FABP2 / толстая кишка	1,07	0,41	0,32
FABP3 / мышца	1,69	0,35	0,38
HMGA1 / печень	2,90**	0,70**	0,70**
MC4R / головной мозг	0,64	-0,33	-0,23
PPARG / печень	3,34**	0,57**	0,55*
PPARG / жировая ткань	0,92	0,11	0,15
PPARGC1A / печень	0,63	-0,22	-0,22
RPTN1 / толстая кишка	0,56	-0,37	-0,36
RPTN1 / головной мозг	0,97	-0,08	-0,10

Примечание: * – различия статистически достоверны ($P \leq 0,05$); ** – различия статистически достоверны ($P \leq 0,01$)

2. Набор олигонуклеотидных праймеров для генотипирования кур по аллелям SNP в нуклеотидной последовательности **PPARG** (полиморфные сайты выделены жирным шрифтом)

PPARG	1FW_A:	ATGTGTATGATGTGGAGCATGA
	1FW_C:	ATGTGTATGATGTGGAGCATGC
	1RV:	TCCTCCTCTTAGGGCTCACA
	2FW_T:	GTGGGATTTCTTGCCTTAATTT
	2FW_C:	GTGGGATTTCTTGCCTTAATTC
	2RV:	GCCCTTCCCTATCAACTGTG
	3FW_T:	TAAGAGGAGGAAGAATTACGGT
	3FW_G:	TAAGAGGAGGAAGAATTACGGG
	3RV:	TCCAAAACCGTTGTTACGAA

3. Среднее значение и частоты генотипов для признака «отложение абдоминального жира» у бройлеров по гену **PPARG**

Признак	Генотип					
	AA (n=57)		AC (n=72)		CC (n=21)	
	Среднее значение ± ошибка среднего	Частота генотипов	Среднее значение ± ошибка среднего	Частота генотипов	Среднее значение ± ошибка среднего	Частота генотипов
Масса жира (гр.)	14,2±0,3	0,38	25,3±0,2	0,48	36,1±0,49	0,14
Содержание жира (%)	0,63±0,02	0,38	1,11±0,03	0,48	1,6±0,03	0,14

В ходе экспериментов нами были обнаружены достоверные различия экспрессии гена **HMGA1** в печени «жирных» и «нежирных» бройлеров. Отношение средних значений уровней экспрессии составляет 2,90 ($P \leq 0,01$) в группах с высоким ($3,5 \pm 0,18\%$) и низким ($1,9 \pm 0,56\%$) содержанием абдоминального жира. Уровень экспрессии этого гена коррелирует с содержанием абдоминального жира ($0,70$; $P \leq 0,01$) и массой абдоминального жира ($0,70$; $P \leq 0,01$).

Уровень экспрессии гена **PPARG** в печени также достоверно различается в группах с различным содержанием и массой абдоминального жира. Отношение средних значений уровней экспрессии составляет 3,34 ($P \leq 0,01$). Коэффициент корреляции равен $-0,55$, $P \leq 0,01$ (табл. 1). Ген **PPARG** экспрессируется в клетках печени и кодирует гамма-рецептор, активируемый пролифераторами пероксисом. Этот энзим регулирует транскрипцию различных генов и играет важную роль в дифференцировке адипоцитов. Исследования показали наличие корреляции гиперэкспрессии гена **PPARG** у человека с болезненным ожирением [1]. Экспрессия гена гамма-рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом, связана с развитием болезненного ожирения, диабета, атеросклероза и злокачественных новообразований [2]. Ванг и соавторы показали, что трансфекция синтезированной *in vitro* мРНК **PPARG**gamma (siPPARGgamma) в культивируемые преадипоциты 12-дневных цыплят достоверно ингибирует процессы дифференцировки и усиливает пролиферацию преадипоцитов у кур [3].

В нашем исследовании мы амплифицировали пять фрагментов регуляторной и кодирующей областей экспрессирующей последователь-

ности гена **PPARG**, оказывающей существенное влияние на признак «масса абдоминального жира». Секвенирование этих фрагментов позволило выявить три сайта однонуклеотидного полиморфизма (SNP) гена **PPARG** в регуляторной области (табл. 2).

Далее типировали 150 образцов ДНК бройлеров кросса Иза по первой замене (SNP). Разделение полученных фрагментов проводили методом электрофореза в 1,5-процентном агарозном геле. Статистическую обработку результатов проводили путём сравнения частот генотипов в группах кур с разной массой и содержанием абдоминального жира при помощи программ AtteStat и InStat.

По полученным данным мы провели описательную статистику по гену **PPARG**, кросса Иза, посмотрели связь генотипов AA, AC, CC с массой жира и содержанием жира (табл. 3).

По замене **PPARG** (A>C) получены следующие результаты: преобладали особи с генотипом AC с содержанием жира $25,3 \pm 0,2$ г. В группах кур с высокой ($36,1 \pm 0,49$ г) и низкой ($14,2 \pm 0,3$ г) массой абдоминального жира достоверные различия по частотам генотипов CC и AA соответственно ($P \leq 0,01$).

Выводы.

1. В ходе экспериментов нами были обнаружены достоверные различия экспрессии гена **HMGA1** в печени «жирных» и «нежирных» бройлеров. Отношение средних значений уровней экспрессии составляет 2,90 ($P \leq 0,01$) в группах с высоким ($3,5 \pm 0,18\%$) и низким ($1,9 \pm 0,56\%$) содержанием абдоминального жира. Уровень экспрессии этого гена коррелирует с содержанием абдоминального жира ($0,70$, $P \leq 0,01$) и массой абдоминального жира ($0,70$, $P \leq 0,01$).

2. Уровень экспрессии гена PPAR γ в печени также достоверно различается в группах с различным содержанием и массой абдоминального жира. Отношение средних значений уровней экспрессии составляет 3,34 ($P \leq 0,01$). Коэффициент корреляции равен (-0,55, $P \leq 0,01$).

3. В пределах последовательности гена PPAR γ методом секвенирования выявлено три сайта мононуклеотидного полиморфизма (SNP).

4. Проведён детальный анализ связи частот генотипов AA, AC, CC по первой мононуклеотидной замене (SNP) гена PPAR γ с массой абдоминального

жира и содержанием жира в группе бройлеров кросса Иза.

Литература

1. Dubern B., Lubrano-Berthelier C., Mencarelli M., et al. Mutational analysis of the pro-opiomelanocortin gene in French obese children led to the identification of a novel deleterious heterozygous mutation located in the alpha-melanocyte stimulating hormone domain // *Pediatric Research*. 2008. V. 63. P. 211–216.
2. Hindle A.K., Koury J., Mc Caffrey T., et al. Dysregulation of gene expression within the peroxisome proliferator activated receptor pathway in morbidly obese patients // *Surgical Endoscopy*. 2009. V. 23. P. 1292–1297.
3. Wang Y. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene: a key regulator of adipocyte differentiation in chickens / Wang Y., Mu Y., Ding N., Wang Q., Wang S., Wang N. // *Poultry Science*. 2008. V. 87. P. 226–232.