

Ассоциация ОНП Pro12Ala (rs1801282) гена *PPARG* с уровнем мРНК в интраабдоминальной жировой ткани у женщин

Копытова А.Э.¹, Николаев М.А.^{1,2}, Усенко Т.С.^{1,2}, Мирошникова В.В.^{1,2},
Баженова Е.А.², Беркович О.А.², Баранова Е.И.², Бровин Д.Л.², Пантелеева А.А.^{1,2},
Семенова И.А.¹, Беляева О.Д.², Пчелина С.Н.^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова
Российской академии наук, Гатчина, Россия, e-mail: mitrplsk@pnpi.spb.ru

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: libruni68@gmail.com

По современным представлениям, избыточный вес и ожирение определяются как чрезмерное накопление жира, представляющее риск для здоровья. Несмотря на высокий рост распространенности ожирения, точные молекулярно-генетические механизмы, регулирующие разрастание жировой ткани и развитие сопутствующих ожирению заболеваний, остаются неясными. Наше исследование посвящено изучению влияния однонуклеотидных полиморфных вариантов (ОНП) Pro12Ala (rs1801282) гена *PPARG* на тканеспецифичную экспрессию гена *PPARG* в интраабдоминальной жировой ткани у женщин репродуктивного возраста. В исследование вошли 27 женщин репродуктивного возраста без сахарного диабета типа 2 и сердечно-сосудистых заболеваний (средний возраст 43,00 (30,00–49,00) лет, индекс массы тела 28,73 (18,13–56,18) кг/м²). Скрининг ОНП Pro12Ala *PPARG* проводился методом ПЦР с последующим рестрикционным анализом. Определение относительного уровня мРНК гена *PPARG* проводилось методом количественной ПЦР в режиме реального времени с разработанными нами праймерами и зондами TaqMan. Нами было выявлено, что аллель 12Ala ассоциирован с пониженной экспрессией гена *PPARG* в интраабдоминальной жировой ткани, по сравнению с гомозиготными носителями аллеля Pro12 ($p = 0,029$). Таким образом, ОНП Pro12Ala (rs1801282) гена *PPARG* может оказывать влияние на тканеспецифичную экспрессию гена *PPARG* в интраабдоминальной жировой ткани, что может лежать в основе механизма ассоциации данного варианта с абдоминальным ожирением и сопутствующими заболеваниями.

Ключевые слова: жировая ткань, экспрессия генов, *PPARG*, полиморфные варианты

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Association of Pro12Ala (rs1801282) *PPARG* with *PPARG* mRNA levels in visceral abdominal tissue in females

Kopytova A.E.¹, Nikolaev M.A.^{1,2}, Usenko T.S.^{1,2}, Miroshnikova V.V.^{1,2},
Bazhenova E.A.², Berkovich O.A.², Baranova E.I.², Brovin D.L.², Panteleeva A.A.^{1,2},
Semenova I.A.¹, Belyaeva O.D.², Pchelina S.N.^{1,2}

¹ B.P.Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute of the RAS, Gatchina, Russia, e-mail: mitrplsk@pnpi.spb.ru

² Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Academician I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, St.Petersburg, Russia, e-mail: libruni68@gmail.com

Obesity is considered to be a rapidly growing health problem worldwide. The factors that regulate body fat content and distribution are not fully understood. Our study aimed to investigate whether the Pro12Ala (rs1801282) polymorphism of the *PPARG* gene may influence on *PPARG* expression in visceral adipose tissue in fertile women in Russia. The study included 27 women without type 2 diabetes mellitus and cardiovascular dysfunction (mean age 43.00 (30.00–49.00), BMI 28.73 (18.13–56.18) kg/m²). Genotyping of the Pro12Ala *PPARG* polymorphisms were determined by PCR-RFLP assay. *PPARG* expression were estimated by RT-PCR with TaqMan probes. Our results demonstrated that mRNA *PPARG* level was significantly lower in subjects with the 12Ala allele (AlaAla+AlaPro) than in ProPro genotype carriers ($p = 0,029$). In conclusion, we demonstrate that the Pro12Ala *PPARG* polymorphism may influence to the observed variability in *PPARG* expression in visceral adipose tissue and thereby contribute to the pathogenesis of abdominal obesity in fertile women.

Keywords: adipose tissue, gene expression, *PPARG*, polymorphic variants.

Введение

Абдоминальное ожирение, которое характеризуется избыточным отложением жировой ткани в области живота и верхней части туловища, является признанным фактором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, а также метаболического синдрома и сахарного диабета 2 типа (СД2) [1]. Развитие сопутствующих абдоминальному ожирению заболеваний связывают с эндокринной активностью висцеральной жировой ткани [2, 3].

Транскрипционный фактор гамма-рецептора (PPARG), активируемый пролифераторами пероксисом, является основным фактором адипогенеза и осуществляет контроль экспрессии генов липидного и углеводного обменов в жировой ткани [4]. Pro12Ala наиболее часто встречающийся генетический вариант PPARG, и его частота варьирует в пределах от 2% до 25% в зависимости от этнической принадлежности [5]. В лиганд-независимом активационном домене PPARG нуклеотидная замена С на G- (rs1801282) гена *PPARG*, приводит к аминокислотной замене пролина на аланин (Pro12Ala) [6]. В европейских популяциях аллель 12Ala имеет частоту 6—15% и его наличие ассоциируется с протективным эффектом относительно развития инсулинорезистентности у пациентов с ожирением [7]. В то же время по отношению к развитию ожирения и сердечно-сосудистых заболеваний аллель 12Ala оказывает негативное действие [8]. Многие ассоциативные эффекты данного варианта показаны именно у женщин [7, 8]. Необходимо отметить, что PPARG имеет ряд изоформ, и изоформа белка, содержащая данный аминокислотный остаток (Pro12Ala), присутствует исключительно в жировой ткани, что указывает на тканеспецифичный эффект данной аминокислотной замены. Исследуемый нами полиморфный вариант Pro12Ala находится в неравновесном сцеплении с другими ОНП гена *PPARG*. Так, например, существует прямая связь между транскрипционной способностью PPARG и ОНП С-2821Т, который находится в регуляторной области гена *PPARG* [9]. Pro12Ala находится в неравновесном сцеплении еще с одним ОНП С1431Т, также известным как His477His. Гаплотип Ala-С ассоциирован со снижением массы тела, в сравнении с носителями гаплотипа Pro-Т [10]. В лиганд-связывающем домене PPARG имеются несколько редких миссенс-мутаций Pro495Leu (Pro467Leu), Val318Met (Val290Met), Phe388Leu, Ser289Cys и

Arg425Cys, снижающих трансаактивацию мутантного белка [9, 11]. В более поздних исследованиях описывают мутации в ДНК-связывающем домене (Cys114Arg, Cys131Tyr и Cys162Trp) и в лиганд-связывающем домене (-315Stop и Arg357X). В результате этих мутаций белки не обладают трансаактивационной активностью и не способны связываться с ДНК [12]. До сих пор остается неизученным влияние полиморфных вариантов A-14G, C-681G, и C-689T в промоторе *PPARG* на транскрипцию и функцию белка [9].

Целью данной работы является выявление ассоциаций генетических вариантов ОНП Pro12Ala (rs1801282) гена *PPARG* с уровнем экспрессии гена в интраабдоминальной жировой ткани у женщин репродуктивного возраста.

Для осуществления поставленной цели нами были поставлены следующие задачи:

1. Создать банк ДНК и кДНК группы женщин репродуктивного возраста с избыточным весом, абдоминальным ожирением и нормальной массой тела;
2. Оценить ассоциацию ОНП Pro12Ala гена *PPARG* с уровнем мРНК гена *PPARG* в интраабдоминальной жировой ткани у женщин репродуктивного возраста

Пациенты и методы

Проведение данного исследования одобрено этическим комитетом Первого Санкт-Петербургского медицинского университета им. И.П. Павлова. В исследование вошли 27 женщин репродуктивного возраста без СД2 и сердечно-сосудистых заболеваний (средний возраст 43,00 (30,00—49,00) лет, индекс массы тела 28,73 (18,13—56,18) кг/м²). Среди испытуемых были женщины с ожирением по андроидному типу (абдоминальным ожирением), при котором окружность талии была больше 80 см и индекс массы тела больше 25 кг/м².

Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. Идентификацию ОНП Pro12Ala (rs1801282) *PPARG* проводили методом ПЦР с последующим рестрикционным анализом [8]. Висцеральный интраабдоминальный жир был получен во время лапароскопической холецистэктомии путем забора от большого сальника.

Таблица

Нуклеотидная последовательность праймеров и зондов, используемых для оценки уровня экспрессии генов

Ген <i>PPARG</i>	For	5'- tga -cag-cga-ctt-ggc-aat-3'
	Rev	5'- tgg-gct-tca-cat-tca-gca -3'
	Probe	5'- (FAM) tat-tct-cag-tgg-aga-ccg-ccc-agg-t (RTQ1)- 3'
Ген <i>RACK1</i>	For	5'-gaa-tac-cct-ggg-tgt-gtg-caa-3'
	Rev	5'-gga-cac-aag-aca-ccc-act-ctg-a-3'
	Probe	5'-(R6G) ta-cac-tgt-cca-gga-tga-ga (BHQ2)-3'

Определение относительного уровня мРНК гена *PPARG* проводилось методом количественной ПЦР в режиме реального времени на приборе CFX96 Touch (BioRad, США). Нами разработаны последовательности праймеров и зондов TaqMan (таблица). В качестве референсного гена был использован конститутивно экспрессирующийся в клетках ген *RACK1*. Оценка относительного уровня мРНК гена *PPARG* и проводилась с использованием метода относительных измерений $\Delta\Delta C_t$: [13].

Статистический анализ был проведен с использованием программы SPSS версия 23.0. Проверка полученных вариационных рядов на соответствие нормальному

распределению проводилось методом Шапиро—Уилка. Сравнение вариационных рядов между двумя группами сравнения проводилось с использованием U-критерия Манна—Уитни.

Результаты и обсуждение

Нами выявлено достоверное снижение уровня мРНК гена *PPARG* в интраабдоминальной ткани у носителей аллеля 12Ala (генотипы Pro/Ala и Ala/Ala) в сравнении с гомозиготными носителями аллеля Pro12 ($p = 0,029$) ОНП Pro12Ala (rs1801282) гена *PPARG* в женской популяции (рис. 1). Нами также был проведен корреляционный анализ уровня мРНК гена *PPARG* в висцеральной жировой ткани с индексом массы тела. Корреляции не выявлено ($p > 0,05$) (рис. 2).

Нами впервые была показана ассоциация генотипа Pro/Pro ОНП Pro12Ala (rs1801282) гена *PPARG* с повышенным уровнем экспрессии гена в интраабдоминальной жировой ткани у женщин репродуктивного возраста. Ранее Berhouma R. с соавторами получили аналогичные данные о влиянии данного полиморфного варианта на экспрессию гена *PPARG* в подкожном жире [14]. Ранее нами показана положительная корреляция между уровнем экспрессии гена *PPARG* в интраабдоминальной жировой ткани с уровнем экспрессии и секреции оментина 1. Действие оментина 1 до конца не изучено, но показано, что он может оказывать модулирующие эффекты на процессы воспаления и гомеостаз липидов и глюкозы, а также имеет протективный эффект в отношении развития сердечно-сосудистых заболеваний и СД2 [15]. Необходимо отметить, что висцеральный жир отличается большей эндокринной активностью, чем подкожный [2, 3].

ОНП гена *PPARG* (Pro12Ala) представляет собой замену пролина на аланин в кодоне 12 экзона B, кодирующего дополнительные 28 аминокислот на N конце изоформы PPARG. В случае аллеля 12Ala данная аминокислотная замена сопровождается снижением функциональной активности рецептора PPARG и изменением транскрипции генов-мишеней [16]. Механизм наблюдаемого влияния данного варианта в кодирующей области на уровень экспрессии гена *PPARG* остается неизвестным. Можно предположить сцепление данного варианта с другим ОНП, расположенным в регуляторных областях гена *PPARG*. Однако более логичным представляется вариант изменения опосредованной регуляции гена *PPARG*. Так, среди генов-мишеней, регулируемых PPARG, находится транскрипционный фактор C/EBP α [17], который, в свою очередь, может регулировать экспрессию *PPARG*. Показано, что в промоторной области гена *PPARG* содержатся сайты связывания C/EBP α [18]. Таким образом, транскрипционные факторы PPARG и C/EBP α способны положительно регулировать экспрессию друг друга. Можно предположить, что при наличии аллельного варианта 12Ala гена *PPARG* снижается уро-

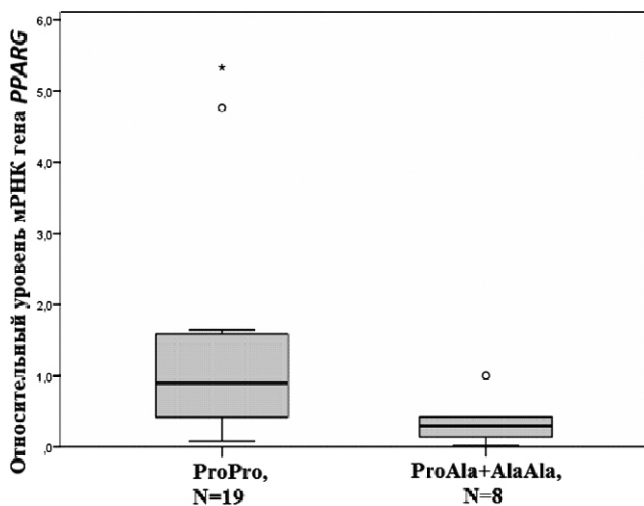


Рис. 1. Относительный уровень мРНК гена *PPARG* у носителей генотипа ProPro и носителей аллеля 12Ala ОНП Pro12Ala (rs1801282) гена *PPARG* в интраабдоминальной жировой ткани. Значения медианы относительного уровня мРНК гена *PPARG* у носителей генотипа ProPro составили 0,84 (0,06–5,33), у носителей аллеля 12Ala (генотипы ProAla и AlaAla) – 0,30 (0,02–1,00).

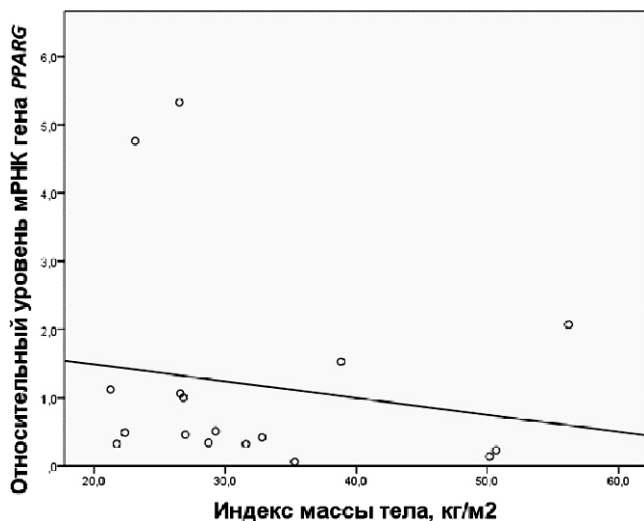


Рис. 2. Корреляционный анализ относительного уровня мРНК *PPARG* и индекса массы тела ($N = 27$, $r = -0,346$, $p > 0,05$).

вень транскрипции генов мишеней, в том числе гена *C/EBPα*, что приводит в результате к снижению активации самого гена *PPARG*.

Вклад данного полиморфного варианта в развитие ожирения является неоднозначным, для людей с избыточной массой тела аллель 12Ala ассоциирован с более высокими значениями индекса массы тела и веса, в то время как у пациентов с нормальной массой тела аналогичных корреляций не наблюдается [19]. В нашем исследовании ассоциации между экспрессией гена *PPARG* в висцеральной жировой ткани с индексом массы тела выявлено не было. Однако стоит отметить, что в виду малочисленности выборки данный корреляционный анализ был проведен только в общей группе ($N = 27$).

Согласно метаанализу, ОНП Pro12Ala гена *PPARG* ассоциирует с развитием сердечно-сосудистых заболеваний. Носители аллеля 12Ala, ассоциированного в нашем исследовании со снижением экспрессии гена *PPARG*, имели повышенный риск развития сердечно-сосудистых заболеваний [20]. С другой стороны, существуют данные, что у носителей аллеля 12Ala гена *PPARG* наблюдается повышение чувствительности тканей к инсулину и, как следствие, снижен риск развития СД2 [8, 15].

Выводы

Благодаря полученным данным можно сказать, что ОНП Pro12Ala (rs1801282) гена *PPARG* может оказывать влияние на тканеспецифичную экспрессию гена *PPARG* в интраабдоминальной жировой ткани, и тем самым вносить вклад в патогенез абдоминального ожирения и сопутствующей патологии у женщин репродуктивного возраста.

Список литературы

1. Mendis S. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control 2011. World Health Organization. 2013. URL: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/
2. Halberg N, Wernstedt I, Scherer PE. The Adipocyte as an Endocrine Cell. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 2008; 37(3):753-768. DOI: 10.1016/j.ecl.2008.07.002.
3. Wajchenberg BL, Giannella-Neto D, da Silva ME, et al. Depot-specific hormonal characteristics of subcutaneous and visceral adipose tissue and their relation to the metabolic syndrome. *Horm. Metab. Res.* 2002;34:616-621. DOI: 10.1055/s-2002-38256.
4. Grygiel-Gorniak. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications — a review. *Nutr J.* 2014;13:17. DOI: 10.1186/1475-2891-13-17.
5. Jeninga, EH, Gurnell, M, Kalkhoven E. Functional implications of genetic variation in human PPARγ. *Trends Endocrinol. Metab.* 2009;20:380-387. DOI: 10.1016/j.tem.2009.04.005
6. Gema Medina-Gomez, Sarah L. Gray, Laxman Yetukuri, et al. PPAR gamma 2 Prevents Lipotoxicity by Controlling Adipose Tissue Expandability and Peripheral Lipid Metabolism. *PLoS Genet.* 2007;3(4):634-647. DOI: 10.1371/journal.pgen.0030064.
7. Chistiakov DA. The PPARγ Pro12Ala variant is associated with insulin sensitivity in Russian normoglycaemic and type 2 diabetic subjects. 2010;(7):156-62. DOI: 10.1177/1479164109347689.
8. Gonzalez Sanchez JL, Serrano Rios M., Fernandez Perez C., et al. Effect of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-2 gene on adiposity, insulin sensitivity and lipid profile in the Spanish population. *Eur. J. Endocrinol.* 2002;147:495-501. URL: <http://www.eje.org>.
9. Costa V, Gallo MA, Letizia F, et al. PPARγ: Gene Expression Regulation and Next-Generation Sequencing for Unsolved Issues. *PPAR Research.* 2010;2010:17. DOI:10.1155/2010/409168.
10. Doney A, Fischer B, Frew D, et al. Haplotype analysis of the PPARγ Pro12Ala and C1431T variants reveals opposing associations with body weight. *BMC Genetics.* 2002;3:21. DOI:10.1186/1471-2156-3-21.
11. Capaccio D, Ciccodicola A, Sabatino L, et al. A novel germline mutation in peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene associated with large intestine polyp formation and dyslipidemia. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1802(6):572-81. DOI: 10.1016/j.bbdis.2010.01.012
12. Agostini M, Schoenmakers E, Mitchell C, et al. Non-DNA binding, dominant-negative, human PPARγ mutations cause lipodystrophic insulin resistance. *Cell Metabolism.* 2006;4(4):303-311. doi:10.1016/j.cmet.2006.09.003.
13. <http://docs.appliedbiosystems.com/pebi/docs/04303859.pdf>
14. Berhouma R, Kouidhi S, Ammar M, et al. Correlation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR-γ) mRNA Expression with Pro12Ala Polymorphism in Obesity. *Biochem Genet.* 2013;(51):256-263. DOI: 10.1007/s10528-012-9560-y.
15. Усенко ТС, Мирошникова ВВ, Баженова ЕА и др. Экспрессия генов *ITLN1*, *PPARγ* и *TNFα* в интраабдоминальной жировой ткани. *Цитология.* 2016 (в печати)
16. Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, et al. A Pro12Ala substitution in PPARc2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet.* 1998;20:284-287. DOI: 10.1038/3099.
17. Rosen ED, Hsu C-H, Wang X, et al. C/EBPα induces adipogenesis through PPARγ: a unified pathway. *Genes Dev.* 2002;16(1):22-26. DOI: 10.1101/gad.948702.
18. Lee J-E, Ge K. Transcriptional and epigenetic regulation of PPARγ expression during adipogenesis. *Cell Biosci.* 2014;4(1):29-39. DOI: 10.1186/2045-3701-4-29.
19. Zarebska A, Jastrzebski Z, Cieszczyk P, et al. The Pro12Ala Polymorphism of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Gene Modifies the Association of Physical Activity and Body Mass Changes in Polish Women. *PPAR Res.* 2014;7. DOI: 10.1155/2014/373782.
20. Li Y, Zhu J, Ding JQ. Association of the PPARγ2 Pro12Ala polymorphism with increased risk of cardiovascular diseases. *Genet. Mol. Res.* 2015;14(4):18662-18674. DOI: 10.4238/2015.