

УДК 575.8.57.017.73

АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНОВ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА ПРИ ДИСЛИПИДЕМИИ

© 2014 г. **И.В. Николаев, Р.В. Мулюкова, Л.Р. Каюмова, Е.В. Воробьева, В.Ю. Горбунова**

Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы, Уфа, Россия, e-mail: obg_bspu@mail.ru

Поступила в редакцию 8 сентября 2014 г. Принята к публикации 15 сентября 2014 г.

В клинической практике часто используют показатели липидного обмена. К его нарушениям (дислипидемии) относят повышение уровня общего холестерина (ОХС), триглицеридов (ТГ), а также изменение ряда других показателей, являющихся результатом нарушения синтеза, транспорта и расщепления липопротеинов. Клиническая значимость метаболических нарушений, объединенных рамками дислипидемии, ассоциируется, в первую очередь, с высоким риском развития сердечно-сосудистых заболеваний, сахарного диабета второго типа и ожирения. Исследована связь *SNP* следующих генов: *G-2548A* в промоторной области гена лептина (*LEP*), *A223G* в 4-м экзоне гена рецептора лептина (*LEPR*), *T495G* в 8-м интроне гена липопротеинлипазы (*LPL*), *C34G* в 8-м экзоне гена ядерного рецептора (*PPARG*), с нарушениями липидного обмена, и показан их кумулятивный эффект в развитии дислипидемии.

Ключевые слова: дислипидемия, лептин, рецептор лептина, липопротеинлипаза, ядерный рецептор.

ВВЕДЕНИЕ

Дислипидемия (гиперлипидемия) – аномально повышенный уровень липидов (липопротеинов) и/или нарушение их соотношения. Выделяют два типа дислипидемий: первичные, генетически обусловленные, и вторичные, приобретенные в результате приема каких-либо лекарственных препаратов либо вследствие болезни. Гиперлипидемия считается важным фактором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, в основном, из-за ее связи со значительным влиянием холестерина на развитие атеросклероза (Ребров, Гайдукова, 2010).

Липиды попадают в организм, главным образом, в форме триглицеридов жирных кислот. В кишечнике под действием ферментов поджелудочной железы они подвергаются гидролизу, продукты которого всасываются клетками стенки кишечника. Здесь из них вновь синтезируются нейтральные жиры, которые через лимфатическую систему поступают в кровь и либо транспортируются в печень, либо отлагаются в

жировой ткани (Марри и др., 1993). В контроль и реализацию процесса метаболизма липидов вовлечено большое число генов и их продуктов. В нашем исследовании были изучены локусы генов четырех наиболее важных из них: генов лептина и его рецептора *LEP* и *LEPR*, липопротеинлипазы *LPL* и γ -рецептора, активируемого пролифератором пероксисом *PPARG*.

Ранее было показано, что *SNP G-2548A* (rs7799039; 7:128238730), локализованный в промоторе гена лептина *LEP*, при замене гуанина на аденин может приводить к уменьшению концентрации лептина и неспособности жировой ткани секретировать этот гормон (Мельниченко, 2001; Wang *et al.*, 2006). По современным представлениям, лептин стимулирует окисление свободных жирных кислот в митохондриях (Schulze, Kratzsch, 2005). Он изменяет метаболизм жиров и глюкозы, а также регулирует нейроэндокринную функцию. Лептин может либо оказывать прямое влияние, либо активировать лептиновые рецепторы в гипоталамусе, которые изменяют экспрессию

нейропептидов и приводят к снижению аппетита, повышению расхода энергии за счет изменения тонуса симпатической системы и обмена веществ в периферических органах и тканях (Schwartz, Seeley, 1997; Мельниченко, 2001; Mantzoros, 2004). SNP A223G (rs1137101, 1:65592830), расположенный в 4-м экзоне гена *LEPR*, может приводить к нарушению рецепции лептина (Park *et al.*, 2006), что увеличивает риск развития ожирения, сахарного диабета второго типа и сердечно-сосудистых заболеваний (Duarte *et al.*, 2007; Constantin *et al.*, 2010).

В нарушении липидного обмена важную роль также играет липопротеинлипаза (LPL) – многофункциональный белок и ключевой фермент метаболизма липидов. Она является основным компонентом триглицерид-насыщенных хиломикрон и липопротеинов очень низкой плотности и играет важную роль в формировании липопротеинов высокой плотности. SNP T495G (rs320, 8:19961566), локализованный в 8-м интроне гена *LPL*, может повышать концентрацию триглицеридов и холестерина (Heinzmann *et al.*, 1991; Ma *et al.*, 2003).

Помимо гидролиза триглицеридов плазмы до диглицеридов липопротеинлипаза также участвует во взаимодействии липопротеинов с ядерными рецепторами (Hayden, Henderson, 1999), в том числе с γ -рецептором, активируемым пролифератором пероксисом (*PPARG*), который определяет дифференциацию адипоцитов и регулирует функционирование генов, связанных с: аккумуляцией жира (синтез триглицеридов), дифференцировкой адипоцитов и миообластов, чувствительностью к инсулину, активностью остеобластов и остеокластов (Semple *et al.*, 2006). SNP C34G (rs1801282, 3:12351626), находящийся в 8-м экзоне гена *PPARG*, ассоциирован со снижением его транскрипционной активности (Montagner *et al.*, 2011), развитием метаболического синдрома (Jeninga *et al.*, 2009) и сахарного диабета второго типа (Laakso, 2004).

Цель настоящего исследования – комплексный анализ взаимодействия аллелей генов, влияющих на метаболизм липидов: *LEP*, *LEPR*, *LPL* и *PPARG*, продукты которых являются биологически активными веществами, специфичными для жировой ткани. Были поставлены следующие задачи: сравнение частот генотипов

и аллелей полиморфных локусов типированных генов в группах с низким и высоким уровнем ОХС и ТГ в сыворотке крови, а также при стратификации индивидов по полу и возрасту; определение и оценка сочетаний аллелей типированных локусов, способствующих или препятствующих высокому уровню ОХС и ТГ в сыворотке крови; определение потенциального влияния мутаций типированных локусов генов на внутриклеточные сигнальные каскады, *in silico* оценка влияния рассмотренных мутаций на физико-химические свойства продуктов соответствующих генов. Для анализа связи SNP G-2548A в гене *LEP*, A223G в гене *LEPR*, T495G в гене *LPL* и C34G в гене *PPARG* с нарушениями липидного обмена в популяции людей, проживающих в Республике Башкортостан, использованы молекулярные, биохимические, статистические и биоинформатические методы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы образцы ДНК 457 (241 мужчина и 216 женщин) практически здоровых лиц, проживающих в Республике Башкортостан. Средний возраст испытуемых составил $23,64 \pm 6,87$ года (от 18 до 63 лет). Забор крови для выделения ДНК производили после медицинского осмотра и анкетирования испытуемых на предмет наличия хронических заболеваний, с их письменного согласия.

Выборка была поделена на три группы: с высоким, низким и нормальным уровнем ОХС и ТГ в сыворотке крови, на основе рекомендаций Всероссийского научного общества кардиологов (Диагностика и коррекция..., 2009), с модификациями (табл. 1). Работа проведена в Центре молекулярно-генетических исследований Башкирского государственного педагогического университета им. М. Акмуллы.

ДНК выделяли методом фенольно-хлороформной экстракции по Мэтью (Mathew, 1984), полимеразную цепную реакцию синтеза ДНК проводили по Мюллису (Mullis *et al.*, 1985), анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов – по Лэйнгдалу (Langdahl *et al.*, 1998), электрофорез в 7%-м полиакриламидном геле – по Маниатису (Маниатис и др., 1984). Результаты электрофореза ДНК визуализировали в ультрафиолетовом свете трансиллюминатора

Таблица 1

Градации показателей общего холестерина и триглицеридов в сыворотке крови человека (по рекомендациям ВНОК, 2009 г. с модификациями)

Показатель	Уровень (концентрация), ммоль/л (<i>n</i>)		
	низкий	высокий	в пределах физиологической нормы
Общий холестерин	до 3,8 (137)	больше 5,2 (63)	3,8–5,2 (257)
$X \pm m$	$3,33 \pm 0,43$	$5,98 \pm 0,63$	$4,45 \pm 0,39$
Триглицериды	до 0,5 (31)	больше 1,7 (62)	0,5–1,7 (364)
$X \pm m$	$0,42 \pm 0,09$	$2,20 \pm 0,56$	$1,05 \pm 0,32$

Здесь и далее: *n* – количество человек, *X* – среднее значение в группе, *m* – ошибка среднего арифметического.

Vilber Lourmart TFX-20M. Материалом для проведения биохимических анализов послужила сыворотка венозной крови, без следов гемолиза, очищенная от эритроцитов и соответствующая специальным требованиям. Уровень ОХС и ТГ определяли ферментным методом с использованием реактивов фирмы Cormay (Германия) на анализаторе «Флюорат-02-АБЛФ-Т».

Проведен как качественный (сравнение частот генотипов и аллелей в изученных группах), так и количественный (однофакторный дисперсионный) анализ связи уровня ОХС и ТГ в сыворотке крови с мутациями в типированных полиморфных локусах генов. Для моделирования воздействия дислипидемии первого типа на человека при частотном анализе сравнивали группы индивидов с низкими и высокими показателями ОХС и ТГ в сыворотке крови. Испытуемые были стратифицированы по гендерному признаку и возрасту. При разделении по возрасту выделено две группы: группа 1 – 18–30 лет (385 человек) и группа 2 – 31–63 года (72 человека).

Для оценки количественных различий в выделенных группах был использован *t*-критерий Стьюдента для независимых выборок. В группах индивидов, различающихся по гендерному признаку, сравнивали частоту аллелей и генотипов типированных полиморфных локусов генов.

Стратификацию индивидов по национальному признаку не проводили, так как определение межэтнических различий не входило в задачи исследования. Для более точной оценки влияния

каждого из типированных локусов на уровень ОХС и ТГ в сыворотке крови проведен однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) без разделения индивидов на группы. Статистические расчеты проводились в программах Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corp., 2002) и Statistica 6.1 (Statsoft Inc, 2007). При попарном сравнении частот генотипов и аллелей в двух различных группах использовали двусторонний критерий Фишера (F). Статистически достоверными считали различия частот аллелей и генотипов при значении $p \leq 0,05$.

Межгенное взаимодействие локусов типированных генов оценивали с помощью программы Multifactor Dimensionality Reduction 2.0 (MDR 2.0), основанной на методе логистической регрессии (Moore *et al.*, 2006). При проведении этого вида расчетов использованы данные индивидов с низким и высоким уровнем ОХС и ТГ.

Биоинформатический анализ нуклеотидных последовательностей полиморфных локусов проводили с применением программы поиска сайтов связывания транскрипционных факторов TFSCAN (Rice *et al.*, 2000; <http://mobylipe.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#forms::tfscan>). Информацию об общегеномной локализации SNP получали из dbSNP, интегрированной в состав базы данных GeneBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov/SNP>). Локализацию сайтов связывания транскрипционных факторов, затрагивающих SNP, приводили в соответствие с их общегеномной локализацией на основе данных Консорциума описания генома человека, доступного в базе данных GeneBank.

Нуклеотидные и аминокислотные последовательности анализировали в двух вариантах: для мутантных и нормальных аллелей изученных генов. Информацию об аминокислотной последовательности белка, а также структурных и функциональных доменах, входящих в его состав, получали из базы данных UniProt (<http://uniprot.org>). Для анализа использовали аминокислотные последовательности канонических изоформ белков. Оценку физико-химических свойств белковых структур проводили в программе ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005; <http://web.expasy.org/protparam>).

Критериями изменения физико-химических свойств белков считали изменение молекулярной массы, изоэлектрической точки, алифатического индекса, являющегося одним из показателей термостабильности (Ikaï, 1980), и индекса нестабильности белка, оценивающего стабильность белка *in vitro*, который у стабильных белков не должен превышать 40 (Guruprasad *et al.*, 1990). При поиске гомологов доменов белков, затронутых мутацией, использовали BLAST-поиск по базе данных Protein Data Bank, с алгоритмом PSI-BLAST (матрица BLOSUM62), реализованным в базе данных GeneBank.

Для оценки конформационных изменений доменов белков под действием изученных мутаций полиморфных локусов генов проводили моделирование пространственных белковых структур при помощи программного комплекса Schrödinger Suite 2013 (Schrödinger Inc., 2013). Файлы-шаблоны для моделирования

с данными о кристаллизованных белковых структурах получали в базе данных Protein Data Bank (<http://pdb.org>). Изменения конформации белковых структур под действием мутаций анализировали в программе Vadar 1.8 (Willard *et al.*, 2003; <http://vadar.wishartlab.com/index.html>). Критериями изменения конформации считали изменение общего объема домена и его доступной площади.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При сравнении групп индивидов, различающихся по гендерному признаку, у женщин выявлено небольшое увеличение средних значений уровня общего холестерина в сыворотке крови по сравнению с мужчинами (4,43 против 4,23 ммоль/л) и уменьшение средних значений уровня ТГ (1,14 против 1,17 ммоль/л), однако статистически достоверных значений оно не достигало (табл. 2).

При разделении индивидов с учетом возраста в старшей возрастной группе (31–63 года) выявлено увеличение среднего уровня ОХС (4,60 против 4,28 ммоль/л), однако оно не достигало статистически значимых значений (табл. 2). В этой же возрастной группе отмечено достоверное увеличение среднего уровня ТГ в сыворотке крови в 1,15 раза (1,30 против 1,13 ммоль/л, $p = 0,019$). Полученные данные согласуются с гипотезой М.А. Даренской и др. (2006) о возрастном повышении уровня липидов в сыворотке крови и изменении ее реологических свойств.

Таблица 2

Общая характеристика исследуемой выборки

Группы	Общий холестерин, ммоль/л	Триглицериды, ммоль/л
Женщины, $n = 216$	4,43 ± 0,89	1,14 ± 0,46
Мужчины, $n = 241$	4,23 ± 0,97	1,17 ± 0,65
$p (\chi^2)$	> 0,05	> 0,05
Группа 1 (средняя, 18–30 лет), $n = 385$	4,28 ± 0,93	1,13 ± 0,57
Группа 2 (старшая, 31–63 года), $n = 72$	4,60 ± 0,95	1,30 ± 0,54
$p (\chi^2)$	> 0,05	0,019

Анализ ассоциаций исследуемых ДНК-локусов с уровнем общего холестерина и триглицеридов

Сравнительный анализ распределения частот генотипов и аллелей генов *PPARG*, *LPL*, *LEP* и *LEPR* показал статистически значимые различия между группами индивидов, разделенными по гендерному признаку. Частота генотипа *LPL*G/*G* в группе женщин была достоверно выше, чем в группе мужчин (0,34 против 0,22, $p = 0,008$, $\chi^2 = 7,37$). Частота аллеля *LPL*G* у женщин также была достоверно выше (0,59 против 0,53, $p = 0,03$, $\chi^2 = 4,3$). Этот факт можно объяснить различиями в метаболизме липидов у женщин и мужчин (Després *et al.*, 2000).

PPARG. При анализе распределения частот генотипов и аллелей полиморфного варианта гена *PPARG* с учетом показателя общего холестерина выявлены достоверные различия (табл. 3). В группе лиц с низким уровнем ОХС обнаружено повышение аллеля *PPARG*C* по отношению к группе лиц, имеющих высокий уровень ОХС (0,90 против 0,78, $p = 0,009$, $\chi^2 = 6,97$), а также понижение аллеля *PPARG*G* (0,10 против 0,22, $p = 0,009$, $\chi^2 = 6,97$), что мо-

жет указывать на вовлеченность изученного полиморфного варианта С34G (rs1801282) гена *PPARG* в регуляцию метаболизма липидов.

Как известно, снижение активности PPAR γ у носителей аллеля *PPARG*G* подавляет липолиз в адипоцитах, что снижает уровень циркулирующих свободных ЖК и увеличивает утилизацию мышцами глюкозы (Boden, 1997). Кроме того, необходимо отметить тот факт, что исследуемый полиморфный вариант гена *PPARG* снижает транскрипционную активность некоторых генов-мишеней, в том числе гена фактора некроза опухоли α , лептина, резистина, адипонектина (Meirhaeghe *et al.*, 2005). При проведении анализа распределения частот генотипов и аллелей рассматриваемого ДНК-локуса с учетом уровня триглицеридов не выявлено достоверно значимых различий.

LPL. Сравнительный анализ распределения частот генотипов и аллелей полиморфного варианта гена *LPL* с учетом уровня ОХС показал статистически значимые различия (табл. 3). Частота генотипа *LPL*T/*T* в группе индивидов с низким уровнем ОХС в сыворотке крови была достоверно выше, чем в группе с высоким

Таблица 3

Результаты анализа ассоциаций исследуемых ДНК-локусов с показателями общего холестерина и триглицеридов в сыворотке крови (приведены статистически значимые данные)

Генотип/аллель	Уровень ОХС, ммоль/л (n)		p (χ^2)
	низкий, менее 3,8	высокий, более 5,2	
<i>PPARG*C</i>	0,90 \pm 0,02 (135)	0,10 \pm 0,02 (12)	0,009 (6,97)
<i>PPARG*G</i>	0,78 \pm 0,02 (62)	0,22 \pm 0,02 (34)	
<i>LPL*T/*T</i>	0,18 \pm 0,03 (24)	0,05 \pm 0,03 (3)	0,03 (4,97)
<i>LPL*T/*G</i>	0,66 \pm 0,04 (91)	0,49 \pm 0,06 (31)	0,03 (4,68)
<i>LPL*G/*G</i>	0,16 \pm 0,03 (22)	0,46 \pm 0,06 (29)	0,0005 (18,86)
<i>LPL*G</i>	0,49 \pm 0,03 (35)	0,71 \pm 0,04 (25)	0,0007 (15,13)
<i>LPL*T</i>	0,51 \pm 0,03 (59)	0,29 \pm 0,04 (26)	
	Уровень ТГ, ммоль/л		
	низкий, менее 0,5	высокий, более 1,7	
<i>LPL*G/*G</i>	0,19 \pm 0,04 (6)	0,44 \pm 0,06 (27)	0,04 (4,28)
<i>LPL*G</i>	0,52 \pm 0,06 (32)	0,69 \pm 0,04 (86)	0,03 (4,87)
<i>LPL*T</i>	0,48 \pm 0,06 (30)	0,31 \pm 0,04 (38)	

уровнем (0,18 против 0,05, $p = 0,03$, $\chi^2 = 4,97$). Гетерозиготный генотип LPL^*T^*/C также наблюдался с достоверно большей частотой (0,66 против 0,49, $p = 0,03$, $\chi^2 = 4,68$). Частота генотипа LPL^*G^*/G выше в группе лиц с высоким уровнем ОХС в сыворотке крови (0,46 против 0,16, $p = 0,0005$, $\chi^2 = 18,86$). Частота аллеля LPL^*G достоверно выше в группе с высокими значениями ОХС в сыворотке крови (0,71 против 0,49, $p = 0,0007$, $\chi^2 = 15,13$).

При проведении анализа распределения частот генотипов и аллелей описываемого полиморфного варианта гена LPL с учетом уровня триглицеридов выявлены достоверные различия (табл. 3). В группе лиц с высоким уровнем ТГ отмечено повышение генотипа LPL^*G^*/G (0,44 против 0,19 в группе лиц с низким уровнем ТГ, $p = 0,04$, $\chi^2 = 4,28$) и аллеля LPL^*G (0,69 против 0,52, $p = 0,03$, $\chi^2 = 4,87$). Как полагают Ма и соавт. (Ma *et al.*, 2003), наличие генотипа LPL^*T^*/T – один из факторов, определяющих физиологически нормальную концентрацию триглицеридов.

LEP и *LEPR*. Анализ сравнения частот генотипов и аллелей анализируемых ДНК-локусов *LEP* и *LEPR* в группах, разделенных с учетом показателей ОХС и ТГ, не выявил достоверных различий. Поэтому было решено провести количественную оценку влияния аллелей и генотипов изученных генов на уровень ОХС и ТГ в сыворотке крови.

Однофакторный дисперсионный анализ

Проведенный однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) позволил количественно оценить влияние аллелей и генотипов типированных полиморфных локусов генов на уровень рассматриваемых показателей. В результате однофакторного дисперсионного анализа выявлено статистически значимое влияние генотипа LPL^*G^*/G на высокий уровень общего холестерина ($F = 24,16$, $p = 0,0001$) и триглицеридов ($F = 11,97$, $p = 0,001$). Как показано ANOVA, на низкий уровень триглицеридов влияет наличие в генотипе аллеля LPL^*T ($F = 4,77$, $p = 0,03$). Полученные данные согласуются с исследованиями зарубежных ученых, которые показали ассоциацию мутантного аллеля LPL^*G с первичной гиперлипидемией у европейцев и

японцев (Kathiresan *et al.*, 2008), а также у белых американцев с высокой концентрацией ОХС в сыворотке крови (Cooper *et al.*, 2007).

При исследовании взаимосвязи полиморфного варианта с показателем триглицеридов выявлены статистически более высокие значения ТГ у обладателей генотипа $LEPR^*G^*/G$ ($F = 8,13$, $p = 0,005$). Вероятно, уровень ТГ в сыворотке крови увеличивается вследствие того, что этот мутантный аллель обуславливает нарушение рецепции лептина, в результате чего у человека плохо работает чувство насыщения (Sun *et al.*, 2010). В целом, данные, полученные в результате сравнительного анализа частот генотипов и аллелей, согласуются с результатами однофакторного дисперсионного анализа, что еще раз подтверждает важную роль описываемых ДНК-локусов в метаболизме липидов, в частности общего холестерина и триглицеридов.

Анализ межгенных взаимодействий

С помощью программы MDR 2.0 была проведена оценка характера взаимодействия полиморфных локусов: G-2548A гена *LEP*, A223G гена *LEPR*, T495G гена *LPL*, C34G гена *PPARG* с высокими показателями ОХС и ТГ. Были выбраны оптимальные, статистически значимые, четырехфакторные модели взаимодействия аллелей генов липидного обмена (*LEP*, *LEPR*, *LPL*, *PPARG*). Отобраны сочетания генотипов типированных локусов генов, приводящие к высокому уровню ОХС ($> 5,2$ ммоль/л) и ТГ ($> 1,7$ ммоль/л) в сыворотке крови, а также препятствующие развитию этого признака во всей рассмотренной выборке индивидов (табл. 4).

Анализ результатов работы программы MDR 2.0 показал, что наибольшее влияние на появление высокого уровня ОХС и ТГ оказывают аллели генов лептина *LEP* и липопротеинлипазы *LPL*. Сочетания генотипов, вовлеченных в регуляцию уровня ОХС, различались между собой мутантным аллелем гена липопротеинлипазы LPL^*G – фермента, осуществляющего функцию синтеза липопротеинов высокой плотности из липопротеинов низкой плотности только при нормальной концентрации этого фермента в сыворотке крови (Ma *et al.*, 2003). Анализ графического изображения модели взаимодействия локусов (рисунок, а), определяющих высокий

Таблица 4

Характеристика моделей межгенных взаимодействий исследуемых полиморфных ДНК-локусов

Признак	Tr. Bal. Асс	Ts. Bal. Асс	Se	Sp	CV Cons	Общий p (χ^2)	OR	Влияние
Высокий ОХС	<i>LEP*A/*G, LEPR*A/*G, PPARG*C/*C, LPL*G/*G</i>							+
	<i>LEP*A/*G, LEPR*A/*G, PPARG*C/*C, LPL*G/*T</i>							-
	0,77	0,63	0,78	0,76	10/10	< 0,0001 (51,43)	11,03 (5,42–22,47)	
Высокий ТГ	<i>LEP*A/*G, LEPR*A/*G, PPARG*C/*C, LPL*G/*T</i>							+
	<i>LEP*G/*G, LEPR*A/*G, PPARG*C/*C, LPL*G/*T</i>							-
	0,76	0,50	0,69	0,81	10/10	< 0,0001 (20,73)	9,43 (3,33–26,73)	

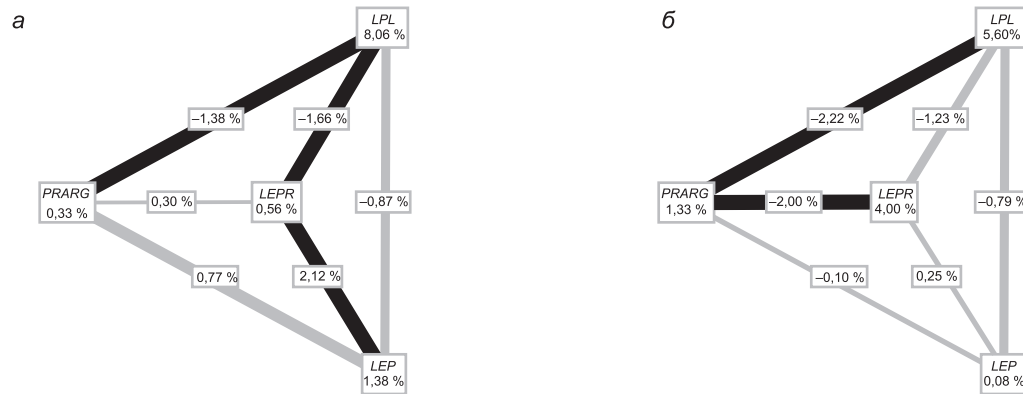
Примечание. Tr. Bal. Асс – тренировочная сбалансированная точность; Ts. Bal. Асс – тестируемая сбалансированная точность; Se – чувствительность модели, Sp – специфичность; CV Cons – повторяемость пересчетов; OR – отношение шансов; +/- – способствующее/препятствующее развитию признака сочетание генотипов.

уровень ОХС, показал наличие дублирующего эффекта, т. е. эффекта полимерии между локусами генов *LEPR*, *PPARG*, *LPL*, *LEP*, и эффекта синергизма, т. е. комплементарности между локусами генов *LEP*, *LEPR* и *PPARG*.

Сочетания генотипов, вовлеченных в регуляцию уровня ТГ в сыворотке крови, различаются по наличию мутантного аллеля гена *LEP*A*, который присутствует в сочетании, способствующем высокому уровню ТГ. Анализ графического изображения модели взаимодействия локусов (рисунок, б), определяющих высокий уровень ТГ, показал наличие связи между локусами генов *LEPR*, *PPARG*, *LPL* и *LEP* по типу полимерии. Выявлено, что сочетание локусов генов, определяющих высокий уровень ОХС в сыворотке крови, отличается от такового сочетания, определяющего высокий уровень ТГ, присутствием мутантного аллеля гена *LPL*G*. При этом генотип, принятый программой MDR 2.0 за препятствующий высокому уровню ОХС в исследованной выборке, способствует высокому уровню ТГ в сыворотке крови. Очень часто проявление гиперхолестеринемии и триглицеридемии сопряжены между собой. Вероятно, возможен кумулятивный эффект действия мутантных аллелей генов *LPL* и *LEP*,

что может привести к манифестации первичной дислипидемии. В исследованных генах изучены сайты связывания транскрипционных факторов и показано, что в результате мутации в гене *LEPR* (SNP A223G) формируется слабой силы потенциальный сайт связывания рецептора эстрогена первого типа ESR1 (GGTCA, 1:65592830-65592834 последовательности генома человека). Некоторые исследования подтверждают вовлеченность этого транскрипционного фактора в регуляцию транскрипции рецептора лептина, развитие дислипидемии и метаболического синдрома (Barros, Gustafsson, 2011; Faulds *et al.*, 2012).

Анализ локуса гена γ -рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом *PPARG*, несущего SNP C34G, выявил, что в случае мутации данного локуса исчезает средней силы потенциальный сайт связывания транскрипционного фактора CREB1 (TGACG, 3:12351622-12351626 последовательности генома человека). CREB1 вовлечен в регуляцию работы большого числа генов. Он своеобразный переключатель многих молекулярных процессов внутри клетки (Bartsch *et al.*, 1998). Возможно, отсутствие данного сайта связывания CREB1 приводит к описанному типу манифестации SNP C34G гена



Графическое изображение результатов анализа взаимодействий между генами при отклонении от физиологической нормы уровня общего холестерина (а) и триглицеридов (б). Толщина линий графа демонстрирует силу взаимодействий локусов, цвет линий графа – характер взаимодействия локусов, проценты на гранях и вершинах графа – уровень энтропии оптимального взаимодействия элементов системы.

PPARG. Этот факт подтвержден в модельном эксперименте, поставленном на мышах, в ходе которого показано, что у мышей с дефицитом CREB1 наблюдались гиперэкспрессия *PPARG* и нарушения в работе печени (Herzig *et al.*, 2003). Для локусов генов *LEP* и *LPL* изменений профиля сайтов связывания транскрипционных факторов выявлено не было. При дальнейшем проведении исследования ввиду большей информативности подробно рассматривали два локуса: *LEPR* и *PPARG*.

Анализ информации, представленной в базе данных UniProt, выявил, что SNP A223G, локализованный в гене *LEPR*, затрагивает экстрацеллюлярную цепь белка, осуществляющую рецепторную функцию, а SNP C34G, локализованный в гене *PPARG*, изменяет гидрофобные свойства цепи белка. Поиск по базе данных Protein Data Bank установил, что домены белков, затронутые изучаемыми мутациями, в ней не представлены. Для моделирования пространственных структур изучаемых доменов белковых продуктов генов *LEPR* и *PPARG* брали аминокислотные последовательности белковых структур канонических изоформ белков (P48357-1, P37231-1), депонированных в базе данных UniProt: для *LEPR* – позиции белковой последовательности 98–248 аминокислоты, для *PPARG* – позиции 1–51 аминокислоты.

Для анализируемых доменов рассмотренных белков в базе данных Protein Data Bank были найдены кристаллизованные белковые структуры, пригодные в качестве шаблонов при

моделировании. Для *LEPR* – 3V6O (комплекс рецептора лептина *LEPR* с моноклональными антителами мыши). Цепь А этой структуры обладает гомологией 37 % с анализируемым нами доменом, что выше порогового значения в 30 % и позволяет достоверно судить о действии рассматриваемой мутации на белковый домен (Pipel, Lancet, 1999). Для *PPARG* – 1DP4 (А-рецептор предсердного натрийуретического пептида), гомология составила 34 %. Изменение химических свойств белков *LEPR* и *PPARG* и конформации их доменов под действием SNP A223G и C34G изучали при помощи программ Vadar 1.8 и ProtParam (табл. 5). Полученные данные позволили установить, что мутантные аллели генов *LEPR* и *PPARG* ведут к конформационным изменениям доменов белков за счет замены аминокислот, что изменяет их физико-химические свойства. Мутантный аллель гена *LEPR*G* меняет аминокислоту 223 с глицина на аргинин, что увеличивает молекулярную массу белка и изменяет его электростатические свойства. Объем экстрацеллюлярного домена белка, затронутого мутацией, увеличивается, при одновременном увеличении его доступной площади, что, возможно, способно оказывать некоторое влияние на рецепцию лептина (Carrillo-Vázquez *et al.*, 2013; Verkerke *et al.*, 2014).

Мутантный аллель гена *PPARG*C*, обуславливая замену аминокислоты 12 белкового продукта с пролина на аланин, приводит к небольшому уменьшению молекулярной массы белка при уменьшении объема и площади домена,

Таблица 5

Изменение свойств и структуры белков LEPR и PPARG под влиянием SNP A223G и C34G

Белковая структура / аллель гена	Молекулярная масса (Да)	Доступная площадь (А ²)	Общий объем (А ³)	Теоретическая pI (pH)	Индекс нестабильности	Алифатический индекс
LEPR/*A	75219,7	5970,3	6162,7	7,66	45,45	86,12
LEPR/*G	75247,8	6002,9	6221,0	7,85	45,45	86,12
PPARG/*C	57620,1	4845,4	6061,6	5,61	50,20	86,32
PPARG/*G	57594,1	4601,2	5969,1	5,61	49,86	86,51

pI – изоэлектрическая точка белка

затронутого мутацией. Индекс нестабильности белка, характеризующий его нестабильность *in vitro*, уменьшается, увеличивается термостабильность белка, изменяя его гидрофобность. Вероятно, это может влиять на функционирование белка и его способность регулировать дифференциацию адипоцитов и энергетический метаболизм, что повышает риск развития дислипидемии (Ahluwalia *et al.*, 2002).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование выявило особенности влияния мутаций в рассмотренных локусах генов *LEP*, *LEPR*, *PPARG* и *LPL* на метаболизм липидов и его нарушения у индивидов, проживающих в Республике Башкортостан. Отмечены достоверные различия в распределении частот генотипов и аллелей рассмотренных генов в группах индивидов, различающихся по уровню ОХС и ТГ. Методом однофакторного дисперсионного анализа показано количественное влияние генотипов и аллелей типированных генов на уровень ОХС и ТГ в сыворотке крови. Выявлены достоверные гендерные различия в распределении частот генотипов и аллелей, показано достоверное увеличение концентрации ТГ в сыворотке крови у более взрослых индивидов. Анализ межгенных взаимодействий локусов изученных генов позволил установить сочетания генотипов изученных локусов генов, способствующие повышению уровня ОХС и ТГ и приводящие к нарушениям липидного обмена. Методами биоинформатики на примере рецептора лептина *LEPR* и γ -рецептора *PPARG*

изучено возможное конформационное изменение доменов белков, затронутых мутациями полиморфных локусов соответствующих генов, в результате которых изменяются их объем и доступная площадь. Установлено изменение физико-химических свойств белковых структур, обусловленных конформационными изменениями доменов белков *LEPR* и *PPARG*.

Нарушения в генах, кодирующих эти белковые структуры, как и в других рассмотренных, определяют недостаточный уровень выработки соответствующих продуктов, в результате чего не может быть обеспечено нормальное физиологическое соотношение компонентов липидного обмена, что может приводить к гипертрофии жировой ткани и в итоге к увеличению массы тела. На примере локусов генов *LEPR* и *PPARG* показано влияние изученных мутаций на потенциальные сайты связывания транскрипционных факторов, которые могут быть задействованы в регуляторных сигнальных каскадах организма человека, способствуя развитию такого комплексного нарушения, как первичная дислипидемия.

ЛИТЕРАТУРА

- Даренская М.А., Колесникова Л.И., Бардымова Т.П. и др. Закономерности изменений показателей процесса перекисидации липидов у практически здоровых в различные периоды становления репродуктивной системы // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. 2006. № 1 (47). С. 119–122.
- Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза. Рекомендации экспертов Всероссийского научного

- общества кардиологов (четвертый пересмотр). М., 2009. 19 с.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. С. 220–228.
- Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Б. Биохимия человека. М.: Мир, 1993. 384 с.
- Мельниченко Г.А. Ожирение в практике эндокринолога // Русский медицинский журнал. 2001. Т. 9. Вып. 2. С. 61–74.
- Ребров А.П., Гайдукова И.З. Особенности дислипидемии при псориатическом артрите: взаимосвязь с атеросклерозом, факторами сердечно-сосудистого риска и системным воспалением // Саратовский научно-медицинский журнал. 2010. Т. 6. Вып. 3. С. 51–55.
- Ahluwalia M., Evans M., Morris K. *et al.* // The influence of the Pro12Ala mutation of the PPAR-gamma receptor gene on metabolic and clinical characteristics in treatment-naïve patients with type 2 diabetes // *Diabetes Obes. Metab.* 2002. No. 4 (6). P. 376–378.
- Barros R.P., Gustafsson J.A. Estrogen receptors and the metabolic network // *Cell Metab.* 2011. No. 14 (3). P. 289–299.
- Bartsch D., Casadio A., Karl K.A., Serodio P., Kandel E.R. CREB1 encodes a nuclear activator, a repressor, and a cytoplasmic modulator that form a regulatory unit critical for long-term facilitation // *Cell.* 1998. No. 95. P. 211–223.
- Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM // *Diabetes.* 1997. No. 46. P. 3–10.
- Carrillo-Vázquez J.P., Chimal-Vega B., Zamora-Lwpez B. Structural consequences of the polymorphism Q223R in the human leptin receptor: A molecular dynamics study // *Am. J. Agric. Biol. Sciences.* 2013. No. 8 (3). P. 239–248.
- Constantin A., Costache G., Sima A. *et al.* Leptin G-2548A and leptin receptor Q223R gene polymorphisms are not associated with obesity in Romanian subjects // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010. No. 391 (1). P. 282–286.
- Cooper A., Spirin V., Schmidt S. *et al.* Common single-nucleotide polymorphisms act in concert to affect plasma levels of high-density lipoprotein cholesterol // *Am. J. Hum. Genet.* 2007. No. 81. P. 1298–1303.
- Després J.P., Couillard C., Gagnon J. *et al.* Race, visceral adipose tissue, plasma lipids, and lipoprotein lipase activity in men and women: the health, risk factors, exercise training, and genetics (heritage) family study // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000. No. 20. P. 1932–1938.
- Duarte S., Francischetti E., Genelhu V. *et al.* LEPR p.Q223R, beta3-AR p.W64R and LEP c.-2548G>A gene variants in obese Brazilian subjects // *Genet. Mol. Res.* 2007. No. 6 (4). P. 1035–1043.
- Faulds M.H., Zhao C. *et al.* The diversity of sex steroid action: regulation of metabolism by estrogen signaling // *Journal Endocrinology.* 2012. No. 212. P. 3–12.
- Jeninga E.H., Gurnell M., Kalkhoven E. Functional implications of genetic variation in human PPAR γ // *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 2009. V. 20. No. 8. P. 380–387.
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A. *et al.* Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. The Proteomics Protocols Handbook. T.: Humana Press, 2005. P. 571–607.
- Guruprasad K., Reddy B.V., Pandit M.W. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence // *Protein Eng.* 1990. No. 4. P. 155–161.
- Hayden M.R., Henderson H. The molecular biology and genetics of human lipoprotein lipase. *Lipoproteins in Health and Disorder.* L., 1999. P. 132–137.
- Heinzmann C., Kirchgessner T., Lüscher A. DNA polymorphism haplotypes of the human lipoprotein lipase gene // *Hum. Genet.* 1991. No. 86. P. 578–584.
- Herzig S., Hedrick S., Morante I. *et al.* CREB controls hepatic lipid metabolism through nuclear hormone receptor PPAR- γ // *Nature.* 2003. No. 426. P. 190–193.
- Ikai A.J. Thermostability and aliphatic index of globular proteins // *J. Biochem.* 1980. No. 88. P. 1895–1898.
- Kathiresan S., Melander O., Anevski D. *et al.* Polymorphisms associated with cholesterol and risk of cardiovascular events // *New Eng. J. Med.* 2008. No. 358. P. 1240–1249.
- Laakso M. Gene variants, insulin resistance, and dyslipidemia // *Curr. Opin. Lipidol.* 2004. V. 2. No. 15. P. 115–120.
- Langdahl B.L., Ralston S.H., Grant S.F., Eriksen E.F. An S1 binding site polymorphism in the *COL1A1* gene predicts osteoporotic fractures in both men and women // *J. Bone Miner Res.* 1998. No. 13 (9). P. 1384–1389.
- Ma Y.Q., Thomas G.N., Ng M. The lipoprotein lipase gene HindIII polymorphism is associated with lipid levels in early-onset type 2 diabetic patients. // *Metabolism.* 2003. No. 52 (3). P. 338–343.
- Mantzoros C.S. Leptin and the hypothalamus: neuroendocrine control of food intake // *Mol. Psychiatry.* 2004. V. 4. P. 8–12.
- Mathew C.C. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA // *Methods molecular biology.* N.Y., 1984. V. 2. P. 31–34.
- Meirhaeghe A., Cotel D., Amouyel P., Dallongeville J. Association between peroxisome proliferator-activated receptor γ haplotypes and the metabolic syndrome in French men and women // *Diabetes.* 2005. No. 54. P. 3043–3048.
- Moore J.H. *et al.* A flexible computational framework for detecting, characterizing, and interpreting statistical patterns of epistasis in genetic studies of human disease susceptibility // *J. Theoretical Biology.* 2006. No. 241. P. 252–261.
- Montagner A., Rando G., Degueurce G. *et al.* New insights into the role of PPARs // *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty Acids.* 2011. V. 85. No. 5. P. 235–243.
- Mullis K.B., Saiki R.K., Scharf S. *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia // *Science.* 1985. V. 230. No. 4732. P. 487–491.
- Park K.S., Shin H.D., Park B.L. *et al.* Polymorphisms in the leptin receptor (LEPR) – putative association with obesity and T2DM // *Genet.* 2006. No. 51. P. 85–91.
- Pipel Y., Lancet D. The variable and conserved interfaces of modeled olfactory receptor proteins // *Protein Science.* 1999. No. 8. P. 969–977.
- Rice P., Longden I., Bleasby A. The European Molecular Biology Open Software Suite // *Trends in Genetics.* No. 16 (6). 2000. P. 276–277.

- Schulze P., Kratzsch J. Leptin as a new diagnostic tool in chronic heart failure // *Clin.Chim. Acta.* 2005. V. 362. P. 1–11.
- Schwartz M.W., Seeley R.J. Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess medical center: Neuroendocrine responses to starvation and weight loss // *New Engl. J. Med.* 1997. V. 336. P. 1803–1811.
- Semple R.K., Chatterjee V.K., O’Rahilly S. PPAR gamma and human metabolic disease // *J. Clin. Invest.* 2006. V. 116. No. 3. P. 581–589.
- Sun Q., Cornelis M.C., Kraft P. *et al.* Genome-wide association study identifies polymorphisms in LEPR as determinants of plasma soluble leptin receptor levels // *Hum. Mol. Genet.* 2010. No. 19 (9). P. 1846–1855.
- Verkerke H., Naylor C., Zabeau L. *et al.* Kinetics of leptin binding to the Q223R leptin receptor // *PLoS One.* 2014. No. 9 (4). P. 43–48.
- Wang T.N., Huang M.C., Chang W. *et al.* G-2548A polymorphism of the leptin gene is correlated with extreme obesity in Taiwanese aborigines // *Obesity.* 2006. No. 14 (2). P. 183–187.
- Willard L., Ranjan A., Zhang H. *et al.* VADAR: a web server for quantitative evaluation of protein structure quality // *Nucleic Acids Res.* 2003. No. 31 (13). P. 3316–3319.

ANALYSIS OF THE INTERACTION OF LIPID METABOLISM ALLELES IN DYSLIPIDEMIA

I.V. Nikolaev, R.V. Mulyukova, L.R. Kayumova, E.V. Vorobieva, V.Yu. Gorbunova

Akmulla Bashkir State Pedagogical University, Ufa, Russia,
e-mail: obg_bspu@mail.ru

Summary

Parameters of lipid metabolism in the spectrum of blood serum are the most commonly used indicators in clinical practice. Their disturbances (dyslipidemia) are: elevated levels of total cholesterol and triglycerides, as well as changes of other parameters resulting from aberrations in lipoprotein synthesis, transport and cleavage. The clinical significance of metabolic disorders covered by the term *dyslipidemia* is associated primarily with high risks of cardiovascular diseases, diabetes mellitus type 2, and obesity. Associations of certain SNPs (G-2548A in the promoter region of the leptin gene (*LEP*), A223G in exon 4 of the leptin receptor gene (*LEPR*), T495G in intron 8 in the lipoprotein lipase gene (*LPL*), and C34G in exon 8 of a nuclear receptor (*PPARG*)) with disturbed lipid metabolism have been investigated, and their cumulative contribution to the development of dyslipidemia is demonstrated.

Key words: dyslipidemia, single-nucleotide polymorphism, leptin, leptin receptor, lipoprotein lipase, nuclear receptor.