

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 575.1/.2.018.3

ПАТТЕРН ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *Bhlhe40* В РАЗВИТИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И ЕГО АССОЦИАЦИИ С ПОКАЗАТЕЛЯМИ РОСТА[#]

© 2013 г. X.-S. Lai, C.-G. Zhang, J. Wang, C. Wang, X.-Y. Lan, C.-Z. Lei, H. Chen*

College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Yangling Shaanxi 712100, China

Поступила в редакцию 18.10.2012 г.

Принята к печати 28.02.2013 г.

Белок *Bhlhe40*, входящий в семейство факторов транскрипции с мотивом основной домен-спираль-петля-спираль (bHLH), играет важную роль в регуляции адипогенеза, миогенеза и в развитии метаболического синдрома. В представленной работе изучен паттерн экспрессии гена *Bhlhe40* в тканях крупного рогатого скота и его изменения на трех стадиях развития. Показано, что ген *Bhlhe40* экспрессируется в большинстве тканей, уровень его экспрессии в скелетных мышцах и жировой ткани снижается в ходе развития. В выборке из 1226 особей местных пород крупного рогатого скота методом ПЦР-амплификации с созданием сайтов рестрикции *Bam*HI и *Apa*I и последующим анализом полиморфизма длины рестриционных фрагментов (ACRS ПЦР-ПДФ) идентифицировали две новые мутации в гене *Bhlhe40* – *Ex5 + 114T > C*, *L166R* и *Ex5 + 733A > G*, *S372S*. Частота аллеля *C* в *Bam*I-локусе у разных пород варьирует от 0.210 до 0.340, а аллеля *G* локуса *Apa*I – от 0.030 до 0.114. Не выявлено значимых ассоциаций локуса *Apa*I с показателями роста у животных породы *Nanyang*, однако локус *Bam*I статистически значимо ассоциирован со среднесуточным привесом в возрасте 18 мес. ($P < 0.05$). Заложены основы для дальнейшего изучения функций *Bhlhe40* в миогенезе и адипогенезе крупного рогатого скота. Результаты работы могут внести значительный вклад в развитие селекции и генетики крупного рогатого скота в рамках программы MAS (селекция с использованием генетических маркеров).

Ключевые слова: крупный рогатый скот, *Bhlhe40*, экспрессия, полиморфизм, показатели роста.

DEVELOPMENTAL EXPRESSION PATTERNS AND ASSOCIATION STUDY WITH GROWTH TRAITS OF BOVINE *Bhlhe40* gene, by X.-S. Lai, C.-G. Zhang, J. Wang, C. Wang, X.-Y. Lan, C.-Z. Lei, H. Chen* (College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Yangling Shaanxi 712100, China; *e-mail: lxs19841@163.com; chenhong1212@263.net). As a member of the basic helix-loop-helix (bHLH) family of transcription factors, *Bhlhe40* played an important role in the regulation of adipogenesis, myogenesis and the development of metabolic syndrome. In this study, we investigated the tissue expression patterns and differences of bovine *Bhlhe40* gene during three developmental stages. The result showed that *Bhlhe40* was ubiquitously expressed in most tissues of cattle. In addition, the expression of bovine *Bhlhe40* gene showed a decreasing trend in skeletal muscle and fat during the developmental stages. Then, two novel mutations (*EX5 + 114 T > C*, *L166P* and *EX5 + 733 A > G*, *S372S*) of bovine *Bhlhe40* gene were identified by *Bam*HI and *Apa*I ACRS PCR-RFLP in 1226 individuals from five indigenous cattle breeds in China. Frequencies of allele *C* at the *Bam*HI locus varied from 0.210 to 0.340 among breeds, while frequencies of allele *G* at the *Apa*I locus varied from 0.030 to 0.114. Association analysis revealed no significant association of *Apa*I locus with growth traits in *Nanyang* breed. However, *Bam*HI locus was significantly associated with the average daily gain at 18 months in *Nanyang* cattle ($P < 0.05$). This study aimed to lay the

Принятые сокращения: bHLH – основной домен спираль–петля–спираль (basic Helix-Loop-Helix); *BHLHe40* – белок e40 семейства bHLH (basic Helix-Loop-Helix family member e40); MRF – миогенный регуляторный фактор (Myogenic Regulatory Factor); *MyoD* – фактор D миогенной дифференцировки (Myogenic differentiation factor D); *Myf5* – миогенный фактор 5 (Myogenic factor 5); *PGC-1 α* – коактиватор 1 α рецептора γ , активируемого пролифераторами пероксисом (Peroxisome-proliferator activated receptor γ Co-activator 1 α); *PPAR γ 2* – рецептор γ 2, активируемый пролифераторами пероксисом (Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ 2); *SREBP-1* – белок 1, связывающий стероидный регуляторный элемент (Sterol Regulatory Element Binding Protein 1); *C/EBP β* – ССААТ/энхансер-связывающий белок β (ССААТ/Enhancer Binding Protein β); *MSC* – мезенхимные стволовые клетки (Mesenchymal Stem Cell); *GAPDH* – глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase); *SNP* – однонуклеотидный полиморфизм (Single Nucleotide Polymorphism); *MAS* – селекция с использованием генетических маркеров (Marker-Assisted Selection).

[#] Текст представлен авторами на английском языке.

*Эл. почта: lxs19841@163.com; chenhong1212@263.net

groundwork to further study of *Bhlhe40* function at myogenesis and adipogenesis in bovine and should significantly contribute to cattle breeding and genetics through MAS program.

Keywords: cattle, *Bhlhe40*, expression, polymorphism, growth traits.

DOI: 10.7868/S0026898413050108

Белки семейства факторов транскрипции bHLH играют исключительно важную роль в дифференцировке, росте клеток и апоптозе [1–3]. Семейство bHLH подразделяется на шесть филогенетических групп, выделенных на основе сравнения аминокислотных последовательностей, сайтов связывания с ДНК, а также с учетом присутствия консервативных аминокислотных остатков и специфических доменов [4]. В семейство bHLH входят миогенные регуляторные факторы (MRF) – MyoD, миогенин, Myf5 и MRF4, играющие ключевую роль в развитии скелетных мышц [5].

Член семейства bHLH – *Bhlhe40* (DEC1, STRA13 или BHLHB2) – участвует в регуляции миогенеза. *Bhlhe40* входит в подсемейство Hairy/[E (Sp1)] факторов bHLH, он может связываться с CACGTG-боксами и подавлять транскрипцию генов-мишеней [6]. Показано, что *Bhlhe40* опосредует негативное действие фактора транскрипции SREBP-1 на миогенез на стадии миобластов и миотрубок [8]. Более того, с помощью анализа экспрессии генов с использованием микрочипов в скелетных мышцах больных сахарным диабетом типа 2 показано, что *Bhlhe40* представляет собой потенциальный новый медиатор действия инсулина на транскрипцию генов в скелетных мышцах человека [9].

Кроме того, известно, что *Bhlhe40* играет важную роль в регуляции адипогенеза, онкогенеза и циркадных ритмов в периферических тканях, а также в ответе на гипоксию [10–13]. *Bhlhe40* блокирует адипогенез, репрессировав ген *PPAR γ 2* путем взаимодействия с ССААТ/энхансер-связывающим белком β (С/ЕВР β) [14]. Сверхэкспрессия *Bhlhe40* приводит к ингибированию зависимых от глюкозы и липогенных факторов транскрипции, SREBP-1с и синтазы жирных кислот [15, 16]. С другой стороны, *Bhlhe40* усиливает хондрогенную дифференцировку клеток АТДС5 мыши и мезенхимных стволовых клеток костного мозга кролика [17]. В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что *Bhlhe40* может участвовать в регуляции различных процессов – от адипогенеза и миогенеза до развития метаболического синдрома, что делает ген *Bhlhe40* перспективным кандидатом на роль гена, контролирующего массу тела, ожирение или показатели роста у человека и сельскохозяйственных животных.

Ген *Bhlhe40*, локализованный на хромосоме 22, состоит из пяти экзонов и четырех интронов. К настоящему времени экспрессия гена *Bhlhe40* у

крупного рогатого скота не изучена. В представленной работе определен паттерн экспрессии гена *Bhlhe40* и его изменения в ходе роста и развития крупного рогатого скота. Кроме того, обнаружен полиморфизм этого гена у пяти местных китайских пород и проанализирована их ассоциация с продуктивностью у животных породы Nanyang. Получена полезная для селекции информация о генетических ресурсах. Полученные результаты открывают новое направление исследований и расширяют спектр генетических вариаций гена *Bhlhe40*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Экспрессия гена *Bhlhe40* на трех стадиях развития крупного рогатого скота. Получены образцы девяти тканей животных породы Qinchuan (Shaanxi, КНР), в том числе сердца, печени, селезенки, легких, почек, скелетных мышц, жировой ткани (новорожденные телята и взрослые особи), желудка и тонкого кишечника плодов (120-й день внутриутробного развития, $n = 3$), молодых телят (7 дней после отела, $n = 3$) и взрослых животных (24 мес, $n = 3$). Все животные были здоровыми. Суммарную РНК выделяли из тканей с использованием реагента Trizol (“TaKaRa”, Япония) в соответствии с протоколом производителя и обрабатывали ДНКазой, свободной от РНКаз (“TaKaRa”). Первую цепь ДНК синтезировали с праймером олиго(dT)₁₈ и набором реагентов Prime Script RT (Perfect Real Time, “TaKaRa”). Уровни мРНК гена *Bhlhe40* в девяти тканях определяли с помощью набора SYBR^R Premix ExTaqTM II (Tli RNaseH Plus, “TaKaRa”). Праймеры для кДНК *Bhlhe40* и *GAPDH* (глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа), которые использовали в качестве внутреннего контроля, приведены в табл. 1. ПЦР проводили в следующих условиях: 94°C, 5 мин; затем 30 циклов – 94°C, 30 с; 72°C, 30 с и один цикл – 72°C, 10 мин, используя Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR System (“Bio-Rad”). Каждый образец анализировали в трех повторностях (*Bhlhe40* и *GAPDH*). Относительное число копий мРНК *Bhlhe40* рассчитывали методом 2^{- $\Delta\Delta$ CT}.

Образцы геномной ДНК. Для идентификации SNP гена *Bhlhe* в начале работы использовали ДНК 1226 особей пяти китайских пород крупного рогатого скота: Nanyang (NY, $n = 222$), Jiaxian (JX, $n = 398$), Qinchuan (QC, $n = 210$), Luxi (LX, $n = 163$) и китайская красная степная (Chinese Red Steppe, CRS, $n = 233$). Это основные породы в Китае, их

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе

Праймер	Нуклеотидная последовательность (5' → 3')	T_m , °C	Размер, п.н.	Участок связывания
Bhlhe40-qPCR	F:GCAAGCTGGTGATCTGTCCG R:GAAGATTTTCAGGTCCCGAGTA	60	132	Экзон 4 – 5
GAPDH-qPCR	F:TGACCCCTTCATTGACCTTCA R:ACCCAGTGGACTCCACCACAT	60	201	– 3 – 5
Определение SNP,				
Bhlhe40-P1	F: CCCGAAACCTCCTCCACGAC R: ACCCTGACTGGCAAGAACCC	62	273	5'-UTR* Интрон 1
Bhlhe40-P2	F: GGGTTCTTGCCAGTCAGGG R: AAACCTTTTATTGGAACTTAGCG	55.8	205	– 1 – 2
Bhlhe40-P3	F: CGGGGTGGGGAAGGAGAAG R: GGCAGAGGAGCTGGTTTGG	58	221	– 2 – 3
Bhlhe40-P4	F:CAGACTTTGGGTCACTTGG R: AAGGAGATGATAGCCAGACA	52	157	– 3 – 4
Bhlhe40-P5	F: GAGCCTTCTGAAATGTCTTCC R: TCCTCCGTAGCCGCTGTCT	59.2	401	– 4 Экзон 5
Bhlhe40-P6	F: AGACAGCGGCTACGGAGGAG R: GCGGCAGAGGCATTGAGAC	61	357	– 5 – 5
Bhlhe40-P7	F: TTCTGCCTGCCCTTCTACC R: CCTGCCTCAAATGATCTTGG	57	399	– 5 3'-UTR*

*5'-UTR и 3'-UTR – 5'- и 3'-нетранслируемые области.

разводят в провинциях Henan, Shaanxi, Shandong и Jilin соответственно. Геномную ДНК выделяли из образцов крови согласно [18].

По 80 образцов ДНК каждой породы отбирали случайным образом для формирования пулов. Аликвоты образцов ДНК переносили в одну пробирку, чтобы гарантировать равное присутствие ДНК каждого образца в пуле, и тщательно перемешивали. Пулы геномной ДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР-амплификации и затем секвенировали продукты ПЦР [19].

Идентификация генетических вариантов гена *Bhlhe40* крупного рогатого скота. На основе известной нуклеотидной последовательности гена *Bhlhe40* крупного рогатого скота (GenBank accession NW 001494989) с использованием программы Primer software (версия 5.0) (табл. 1) сконструированы семь пар праймеров для амплификации разных ПЦР-продуктов, включающих полную кодирующую область и часть некодирующих областей. ПЦР-амплификацию проводили в 25 мкл реакционной смеси, которая содержала 0.5 мкМ каждого праймера, 200 мкМ dNTP (dATP, dTTP, dCTP и dGTP), 1× буфер (содержащий 1.5 мМ MgCl₂), 0.625 ед. Taq-ДНК-полимеразы (“МВ1”, Литва) и 50 нг геномной ДНК крупного рогатого скота в качестве матрицы. Условия ПЦР: 4 мин, 94°C;

34 цикла – 94°C, 30 с; 4 мин, 94°C; температура отжига (табл. 1), 30 с; 72°C, 30 с. Заключительная достройка – 72°C, 10 мин.

В результате использования семи пар праймеров, секвенирования пулов ДНК и анализа с помощью программы Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blastn>) идентифицировали две новых мутации в локусах P5 (EX5 + 114T > C) и P7 (EX5 + 733A > G) гена *Bhlhe40*.

Учитывая, что ни один из SNP не перекрывается с природным сайтом рестрикции, для генотипирования отдельных особей применили метод амплификации с созданием сайтов рестрикции (ACRS) с последующим анализом полиморфизма длин рестриционных фрагментов (ПЦР-ПДФ). Для локуса EX5 + 114T > C сконструировали новый прямой праймер (F: 5'-TGGCCAAGCATGAGAATACTCGGGAT/CC-3'), в котором исходный нуклеотид C был превращен в T. Прямой праймер вводит точечную мутацию, которая создает сайт рестрикции BamHI (GGATCC) в ПЦР-продуктах с ДНК особей, несущих аллель C. Напротив, ПЦР-продукты с ДНК животных, несущих аллель T, лишены этого сайта. Сходным образом сконструирован новый прямой праймер (F: AGCTTCATGAACCCAGACAAGATCTG/C-3') для локуса EX5 + 733 A > G.

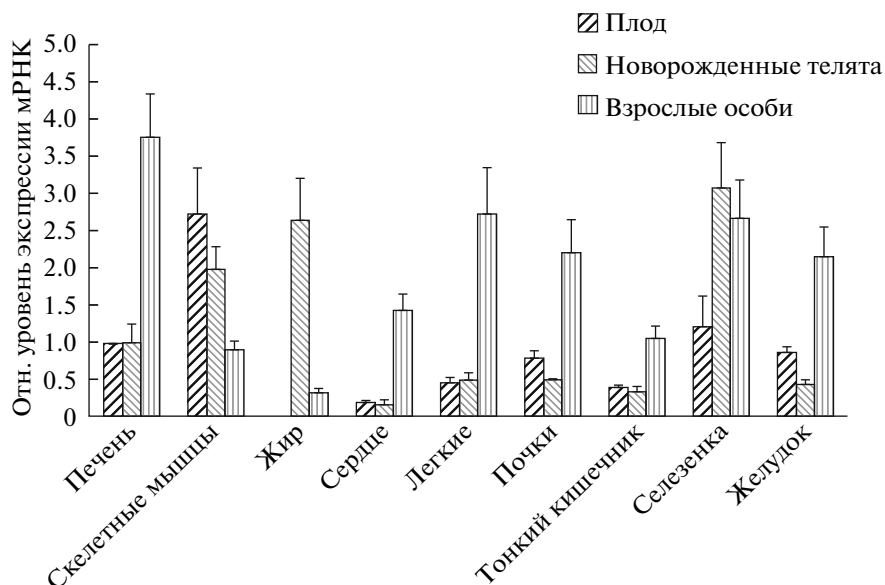


Рис. 1. Результаты анализа экспрессии гена *Bhlhe40* методом количественной ПЦР в реальном времени. Использовали образцы печени, скелетных мышц, жира, сердца, легких, селезенки, почки, тонкого кишечника и желудка трех животных разного возраста. Из-за практически полного отсутствия жира у эмбрионов образцы жира на этой стадии не отбирали.

В этом праймере исходный нуклеотид С заменен на G таким образом, что в ПЦР-продуктах на ДНК животных с аллелем G, но не A, создается сайт рестрикции *ApaI* (GGGCC). ПЦР-продукт (5 мкл) обработали 5 ед. акт. *VamHI/ApaI* (“*MVI Fermentas*”) согласно рекомендациям производителя. Продукты расщепления выявляли электрофорезом в 3.5%-ном агарозном геле и окрашиванием бромидом этидия.

Статистический анализ. Определяли частоты аллелей и генотипов гена *Bhlhe40* и анализировали их соответствие равновесию Харди—Вайнберга. Для анализа ассоциаций с показателями роста использовали программу SPSS (версия 16.0, США). Статистический анализ проводили на основе таких показателей, как вес при рождении, вес, высота и длина, обхват груди, ширина подвздошной кости и среднесуточный привес у животных породы Nanyang в возрасте 6, 12, 18 и 24 мес. Эффекты, ассоциированные с местом происхождения, полом и временем рождения (весна или осень), в линейную модель не включали, так как предварительный статистический анализ показал, что эти параметры не влияют существенно на вариабельность признаков у этой породы. Поэтому для анализа ассоциаций разных генотипов с показателями роста использовали следующую модель [20—23]: $Y_{ij} = \mu + G_i + E_{ij}$, где Y_{ij} — параметр, измеренный у каждого отдельного животного, μ — среднее значение в популяции, G_i — эффект, ассоциированный с i -м генотипом, E_{ij} — случайная ошибка.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Паттерн экспрессии гена Bhlhe40 на трех стадиях развития крупного рогатого скота

С целью определения уровней мРНК гена *Bhlhe40* на трех стадиях развития животных провели ПЦР в реальном времени. Показали, что ген *Bhlhe40* экспрессируется в большинстве тканей на всех стадиях развития (рис. 1). В эмбрионах и у новорожденных телят ген *Bhlhe40* активен в скелетных мышцах и селезенке, а также в жировой ткани новорожденных телят. Однако у взрослых животных наиболее высокий уровень экспрессии этого гена выявлен в печени, легких и селезенке, в скелетных мышцах и жире экспрессия была низкой. Интересно, что в ходе развития уровень мРНК *Bhlhe40* заметно снижается в скелетных мышцах и жировой ткани — двух главных тканях, связанных с показателями роста.

Полиморфизм гена Bhlhe40 крупного рогатого скота

Нами проведен скрининг полной кодирующей области гена *Bhlhe40* крупного рогатого скота, и в экзоне 5 у всех пяти пород идентифицированы две новые мутации, которые можно генотипировать с помощью ACRS ПЦР-ПДРФ *VamHI* и *ApaI* соответственно (рис. 2 и рис. 3). SNP в локусе *VamHI* (EX5 + 114T > C) приводит к замене лейцина на пролин в положении 160 аминокислотной последовательности белка, тогда как SNP в

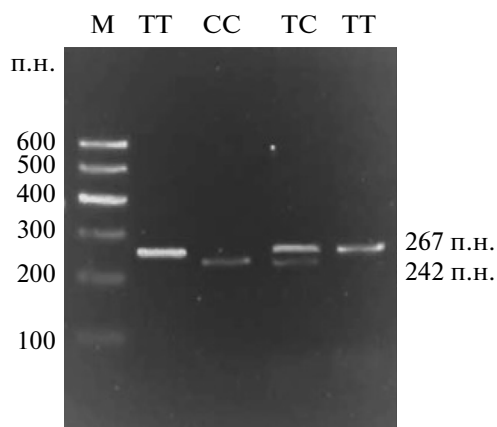


Рис. 2. Электрофореграмма разделения в 3.5%-ном агарозном геле продуктов расщепления рестриктазой *Vam*HI ПЦР-фрагментов гена *Bhlhe40*, содержащих мутацию EX + 114T > C. TT (267 п.н.), CC (242 + 25 п.н.), TC (267 + 242 + 25 п.н.). М – маркер I (600, 500, 400, 300, 200 и 100 п.н.). Фрагмент размером 25 п.н. не виден, поскольку имеет очень маленький размер.

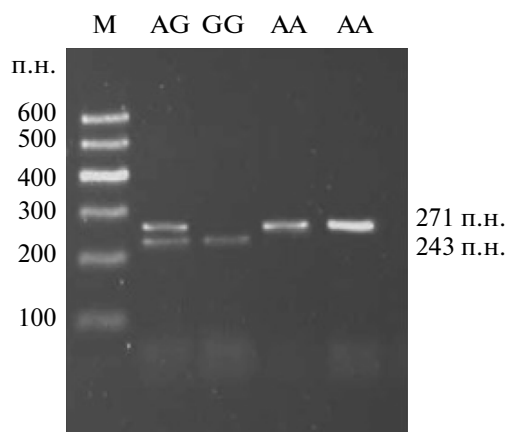


Рис. 3. Электрофореграмма разделения в 3.5%-ном агарозном геле после расщепления рестриктазой *Aar*I ПЦР-продукта, содержащего мутацию EX5 + 733A > G гена *Bhlhe40* крупного рогатого скота. AA (271 п.н.), GG (243 + 28 п.н.), AG (271 + 243 + 28 п.н.); М – маркер I (600, 500, 400, 300, 200, 100 п.н.). Фрагмент размером 28 п.н. не виден из-за малого размера.

локусе *Aar*I (EX5 + 733A > G) создает синонимическую замену в кодоне Ser372.

Происхождение и распределение вариаций гена *Bhlhe40* приведены в табл. 2. Из этих результатов следует, что у изученных пород оба полиморфизма распределены сходным образом. Аллель Т в локусе *Vam*HI и аллель А в локусе *Aar*I преобладают у всех пяти пород – частоты аллеля Т в локусе *Vam*HI варьируют от 0.660 до 0.790, а частоты аллеля А в локусе *Aar*I – от 0.856 до 0.970. Рассчитана также информативность полиморфизмов (*PI*C) – умеренная в случае *Vam*HI-локуса ($0.25 < PIC < 0.5$) и низкая для *Aar*I-локуса ($PIC < 0.25$) у всех пяти пород. Тест χ^2 показал, что у всех пяти по-

род распределение генотипов локуса *Vam*HI соответствует равновесию Харди—Вайнберга ($P < 0.01$).

Ассоциация полиморфизмов с показателями роста у породы *Nanyang*

Связь между двумя SNP и показателями роста (вес тела, высота и длина тела, обхват груди) анализировали у животных породы NY в возрасте 6, 12, 18 и 22 мес. (табл. 3 и табл. 4). Животные с генотипом TT локуса *Vam*HI имели более высокий суточный привес, чем носители генотипа CC ($P < 0.005$) в возрасте 18 мес, тогда как у 6-, 12- и 24-месячных животных отсутствовали значимые различия. Не вы-

Таблица 2. Частоты генотипов и генетическое разнообразие гена *Bhlhe40* крупного рогатого скота

Локус	Порода	Частоты генотипов			Частоты аллелей		N_e	H_e	<i>PI</i> C	<i>P</i>
		TT	TC	CC	Т	С				
<i>Vam</i> HI	NY(222)	0.536	0.248	0.216	0.660	0.340	1.814	0.449	0.348	<0.01
	JX(398)	0.638	0.241	0.121	0.759	0.241	1.577	0.366	0.299	<0.01
	QC(216)	0.634	0.264	0.102	0.766	0.234	1.558	0.358	0.294	»
	LX(166)	0.590	0.277	0.133	0.729	0.271	1.653	0.395	0.317	»
	CRS(233)	0.674	0.232	0.094	0.790	0.210	1.497	0.332	0.277	»
<i>Aar</i> I		AA	AG	GG	A	G				
	NY(222)	0.801	0.149	0.050	0.876	0.124	1.277	0.217	0.194	»
	JX(398)	0.824	0.131	0.045	0.889	0.111	1.245	0.197	0.177	»
	QC(216)	0.792	0.130	0.078	0.856	0.144	1.326	0.246	0.216	»
	LX(166)	0.940	0.060	0.000	0.970	0.030	1.062	0.058	0.057	>0.05
CRS(233)	0.862	0.138	0.000	0.931	0.069	1.147	0.128	0.120	>0.05	

Примечание. H_e – гетерозиготность; N_e – эффективное число аллелей; *PI*C – информативность полиморфизма.

явлено значимых ассоциаций аллелей и генотипов локуса *ApaI* ни с одним из анализируемых показателей роста ($P > 0.05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Bhlhe40 – фактор транскрипции семейства bHLH, участвует в различных процессах, включая хондрогенез [17], нейрогенез [24], задержку роста клеток [25], миогенез [7, 8, 26], адипогенез [14, 16, 27], поддержание мезенхимных стволовых клеток [28]. Поэтому ген *Bhlhe40* считается перспективным претендентом на роль регулятора веса тела, жирности или связанных с ростом признаков у человека и сельскохозяйственных животных. Однако в настоящее время доступна информация лишь о гене *Bhlhe40* человека и мыши, но отсутствуют данные об этом гене крупного рогатого скота или других сельскохозяйственных животных. Учитывая экономическую важность показателей роста для животноводства, актуальность изучения *Bhlhe40* становится очевидной.

Bhlhe40 впервые был идентифицирован в дифференцирующихся эмбриональных хондроцитах человека, стимулированных аналогами cAMP [6]. У мышей содержание мРНК *Bhlhe40* сильно возрастает у эмбрионов с 9.5 по 12.5 день после спаривания и детектируется преимущественно в нейроэктодерме и в некоторых тканях мезодермального и эндодермального происхождения (желудочно-кишечный эпителий, бронхи, паренхима печени). В

постнатальном периоде ген активно экспрессируется в большинстве тканей, включая печень, сердце, почки, головной мозг и мышцы [6, 26]. В настоящей работе определен характер экспрессии гена *Bhlhe40* в тканях и его изменения на трех стадиях развития крупного рогатого скота. Показано, что ген *Bhlhe40* экспрессируется в большинстве тканей. Более того, впервые показано, что уровень мРНК *Bhlhe40* снижается в скелетных мышцах взрослых животных. Сходные изменения обнаружены в жировой ткани, начиная с неонатального периода. Сообщалось, что *Bhlhe40* негативно действует на миогенез и адипогенез у человека и мыши [7, 8, 14]. Наши данные подтверждают, что *Bhlhe40* является важным репрессором транскрипции в ходе миогенеза и адипогенеза. Однако тенденция к снижению его экспрессии требует дальнейшего изучения у других видов животных.

К настоящему времени установлено, что ген *Bhlhe40* консервативен у многих видов, включая шимпанзе, собак, мышей, крыс, кур, полосатого данио и человека [29]. При скрининге полной кодирующей области гена *Bhlhe40* крупного рогатого скота мы обнаружили только две мутации, что говорит о консервативности гена у этого вида. Широкое распространение и высокая консервативность гена *Bhlhe40* указывают на его важную функцию в ходе эволюции. Возможно, что обнаруженные мутации в гене *Bhlhe40* могут влиять на его активность и функции, поэтому необходимо дальнейшее изучение влияния этих вариаций на

Таблица 3. Анализ ассоциаций SNP гена *Bhlhe40* с показателями роста у 18-месячных животных породы NY методом ANOVA

Локус	Признак	Тип III S.S.	<i>df</i>	<i>M.S.</i>	Ошибка	<i>F</i>	<i>P</i>
VamHI	BW18	4827.174	2	2413.587	866.815	2.784	0.067
	ADG18	0.404	2	0.201	0.051	3.951	0.022
ApaI	BW18	1993.788	2	996.893	897.951	1.112	0.333
	ADG18	0.109	2	0.054	0.054	1.007	0.369

Примечание. BW – вес; ADG – среднесуточный привес; *df* – степень свободы; S.S. типа III – сумма квадратов типа III; *M.S.* – среднеквадратичное значение; *F*-value – критерий Фишера.

Таблица 4. Ассоциации SNP гена *Bhlhe40* с показателями роста у 18-месячных животных породы Nanyang

Локус	Признак, кг	Генотип		
		TT	TC	CC
VamHI	BW18	304.83 ± 32.73	302.22 ± 25.59	286.27 ± 28.27
	ADG18	0.463 ± 0.256*	0.461 ± 0.171*	0.307 ± 0.232**
ApaI	BW18	AA	AG	GG
	ADG18	302.33 ± 32.88	291.05 ± 17.96	295.25 ± 8.38
		0.444 ± 0.244	0.359 ± 0.200	0.419 ± 0.124

Примечание. BW – вес; ADG – среднесуточный привес. Наименьшие среднеквадратичные значения в колонках, отмеченные * и **, различаются статистически значимо ($P < 0.05$).

активность *Bhlhe40*. Интересно, что распределение генотипов в обоих полиморфных локусах у большинства изученных пород не соответствует равновесию Харди–Вайнберга. По нашему мнению, возможны два объяснения этого несоответствия. Во-первых, это влияние отбора (стратификация популяции) за счет критериев включения и исключения из селекционного процесса. Более того, различия в смертности (разная сохранность маркерных генов), обусловленные различиями в генетическом и внешнем фоне в данных выборках, также могут быть причиной подобного неравновесия. Во-вторых, изученные нами выборки скорее всего не могут считаться случайными. Поэтому наши данные следует рассматривать как предварительные, требующие подтверждения на более крупных выборках.

У мясных пород скота мутации в генах ключевых генетических факторов миогенеза и адипогенеза могут приводить к фенотипическим вариациям в росте мышечной массы и во вкусовых показателях мяса. *Bhlhe40* играет важную роль в развитии мышц и жировой ткани, поэтому считается, что этот фактор может участвовать в контроле роста скелетных мышц и формировании жировой ткани и влиять тем самым на экономическую эффективность животноводства.

Мы обнаружили мутацию EX5 + 114T > C в локусе *VamNI* – миссенс-мутацию в гене *Bhlhe40* крупного рогатого скота, и выявили ее значимую ассоциацию со среднесуточным привесом у 18-месячных животных. Соответственно, генетические варианты локуса *VamNI* гена *Bhlhe40* рекомендуется использовать в качестве ДНК-маркеров, связанных с показателями роста, в селекции крупного рогатого скота. Однако другая мутация, обнаруженная в локусе *AraI*, не имеет значимой ассоциации с изученными показателями. SNP локуса *AraI* вызывает синонимическую замену и не приводит к замене аминокислотного остатка, т.е. не может влиять на функциональную активность *Bhlhe40*. Понятно, что эта мутация не влияет на показатели роста.

В заключение мы определили характер экспрессии гена *Bhlhe40* в разных тканях на трех стадиях развития животных. Мы обнаружили интересную тенденцию к возрастному снижению уровня экспрессии этого гена в скелетных мышцах и жировой ткани животных. Кроме того, в кодирующей области гена *Bhlhe40* методами ACRS ПЦР-ПДФ *VamNI* и *AraI* идентифицированы две новые мутации (EX5 + 114T > C, L166P и EX5 + 733A > G, S372S). Локус *VamNI* статистически значимо ассоциирован с среднесуточным привесом у животных породы Nanyang в возрасте 18 мес. Представленная работа дает, вероятно, ключ к дальнейшему изучению функций *Bhlhe40* в миогенезе и адипогенезе и вносит важ-

ный вклад в селекцию и генетику крупного рогатого скота с использованием программ MAS.

Работа поддержана National Natural Science Foundation of China (31272480), Program of National Beef Cattle Industrial Technology System (CARS-38), Agricultural Science and Technology Innovation Projects of Shaanxi Province (2012NKC01-13) и National 863 Program of China (Grant No. 2013AA102505).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ross S.E., Greenberg M.E., Stiles C.D. 2003. Basic helix-loop-helix factors in cortical development. *Neuron*. **39**(1), 13–25.
2. Arnold H.H., Winter B. 1998. Muscle differentiation: more complexity to the network of myogenic regulators. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**(5), 539–544.
3. Azmi S., Ozog A., Taneja R. 2004. Sharp-1/DEC2 inhibits skeletal muscle differentiation through repression of myogenic transcription factors. *J. Biol. Chem.* **279**(50), 52643–52652.
4. Atchley W.R., Fitch W.M. 1997. A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**(10), 5172–5176.
5. Sabourin L.A., Rudnicki M.A. 2000. The molecular regulation of myogenesis. *Clin. Genet.* **57**(1), 16–25.
6. Shen M., Kawamoto T., Yan W., Nakamasu K., Tamagami M., Koyano Y., Noshiro M., Kato Y. 1997. Molecular characterization of the novel basic helix-loop-helix protein DEC1 expressed in differentiated human embryo chondrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**(2), 294–298.
7. Hsiao S.P., Huang K.M., Chang H.Y., Chen S.L. 2009. P/CAF rescues the *Bhlhe40*-mediated repression of MyoD transactivation. *Biochem. J.* **422**(2), 343–352.
8. Lecomte V., Meugnier E., Euthine V., Durand C., Freyssenet D., Nemoz G., Rome S., Vidal H., Lefai E. 2010. A new role for sterol regulatory element binding protein 1 transcription factors in the regulation of muscle mass and muscle cell differentiation. *Mol. Cell Biol.* **30**(5), 1182–1198.
9. Rome S., Meugnier E., Lecomte V., Berbe V., Besson J., Cerutti C., Pesenti S., Granjon A., Disse E., Clement K., Lefai E., Laville M., Vidal H. 2009. Microarray analysis of genes with impaired insulin regulation in the skeletal muscle of type 2 diabetic patients indicates the involvement of basic helix-loop-helix domain-containing, class B, 2 protein (BHLHB2). *Diabetologia.* **52**(9), 1899–1912.
10. Grechez-Cassiau A., Panda S., Lacoche S., Teboul M., Azmi S., Laudet V., Hogenesch J.B., Taneja R., Delaunay F. 2004. The transcriptional repressor STRA13 regulates a subset of peripheral circadian outputs. *J. Biol. Chem.* **279**(2), 1141–1150.
11. Turley H., Wykoff C.C., Troup S., Watson P.H., Gatter K.C., Harris A.L. 2004. The hypoxia-regulated transcription factor DEC1 (Stra13, SHARP-2) and its expression in human tissues and tumours. *J. Pathol.* **203**(3), 808–813.
12. Giatromanolaki A., Koukourakis M.I., Sivridis E., Turley H., Wykoff C.C., Gatter K.C., Harris A.L. 2003. DEC1 (STRA13) protein expression relates to hypoxia-

- inducible factor 1-alpha and carbonic anhydrase-9 overexpression in non-small cell lung cancer. *J. Pathol.* **200**(2), 222–228.
13. Thin T.H., Li L., Chung T.K., Sun H., Taneja R. 2007. Stra13 is induced by genotoxic stress and regulates ionizing-radiation-induced apoptosis. *EMBO Rep.* **8**(4), 401–407.
 14. Park Y.K., Park H. 2012. Differentiated embryo chondrocyte 1 (DEC1) represses PPARgamma2 gene through interacting with CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBPbeta). *Mol. Cells.* **33**(6), 575–581.
 15. Choi S.M., Cho H.J., Cho H., Kim K.H., Kim J.B., Park H. 2008. Stra13/DEC1 and DEC2 inhibit sterol regulatory element binding protein-1c in a hypoxia-inducible factor-dependent mechanism. *Nucl. Acids Res.* **36**(20), 6372–6385.
 16. Iizuka K., Horikawa Y. 2008. Regulation of lipogenesis via BHLHB2/DEC1 and ChREBP feedback looping. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **374**(1), 95–100.
 17. Shen M., Yoshida E., Yan W., Kawamoto T., Suardita K., Koyano Y., Fujimoto K., Noshiro M., Kato Y. 2002. Basic helix-loop-helix protein DEC1 promotes chondrocyte differentiation at the early and terminal stages. *J. Biol. Chem.* **277**(51), 50112–50120.
 18. Sambrook J.J., Russell D.W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press.
 19. Sham P., Bader J.S., Craig I., O'Donovan M., Owen M. 2002. DNA Pooling: a tool for large-scale association studies. *Nat. Rev. Genet.* **3**(11), 862–871.
 20. Lan X.Y., Pan C.Y., Chen H., Zhang C.L., Li J.Y., Zhao M., Lei C.Z., Zhang A.L., Zhang L. 2007. An AluI PCR-RFLP detecting a silent allele at the goat *POUIF1* locus and its association with production traits. *Small Rumin. Res.* **73**, 8–12.
 21. Zhang C., Liu B., Chen H., Lan X., Lei C., Zhang Z., Zhang R. 2009. Associations of a HinfI PCR-RFLP of *POUIF1* gene with growth traits in Qinchuan cattle. *Animal. Biotechnol.* **20**(2), 71–74.
 22. Zhang C.L., Wang Y.H., Lei C.Z., Fang X.T., Chen H. 2011. The polymorphisms of bovine melanocortin-3 receptor pseudogene. *Res. Vet. Sci.* **90**(2), 241–244.
 23. Lai X., Lan X., Chen H., Wang X., Wang K., Wang M., Yu H., Zhao M. 2009. A novel SNP of the *Hesx1* gene in bovine and its associations with average daily gain. *Mol. Biol. Rep.* **36**(7), 1677–1681.
 24. Rossner M.J., Dorr J., Gass P., Schwab M.H., Nave K.A. 1997. SHARPs: mammalian enhancer-of-split- and hairy-related proteins coupled to neuronal stimulation. *Mol. Cell Neurosci.* **10**(3-4), 460–475.
 25. Sun H., Taneja R. 2000. Stra13 expression is associated with growth arrest and represses transcription through histone deacetylase (HDAC)-dependent and HDAC-independent mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**(8), 4058–4063.
 26. Sun H., Li L., Vercherat C., Gulbagci N.T., Acharjee S., Li J., Chung T.K., Thin T.H., Taneja R. 2007. Stra13 regulates satellite cell activation by antagonizing Notch signaling. *J. Cell Biol.* **177**(4), 647–657.
 27. Yun Z., Maecker H.L., Johnson R.S., Giaccia A.J. 2002. Inhibition of PPAR gamma 2 gene expression by the HIF-1-regulated gene DEC1/Stra13: a mechanism for regulation of adipogenesis by hypoxia. *Dev. Cell.* **2**(3), 331–341.
 28. Iwata T., Kawamoto T., Sasabe E., Miyazaki K., Fujimoto K., Noshiro M., Kurihara H., Kato Y. 2006. Effects of overexpression of basic helix-loop-helix transcription factor Dec1 on osteogenic and adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Eur. J. Cell Biol.* **85**(5), 423–431.
 29. Yao J., Wang L., Chen L., Zhang S., Zhao Q., Jia W., Xue J. 2006. Cloning and developmental expression of the DEC1 ortholog gene in zebrafish. *Gene Exp. Patterns.* **6**(8), 919–927.