

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.136.54>

## ОЦЕНКА ОТНОСИТЕЛЬНОГО УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *BMP-2* У РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ В РАЗНОМ ВОЗРАСТЕ

Научная статья

Щербаков Ю.С.<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> ORCID : 0000-0001-6434-6287;

<sup>1</sup> Всероссийский НИИ генетики и разведения сельскохозяйственных животных, Санкт-Петербург, Российская Федерация

\* Корреспондирующий автор (yura.10.08.94.94[at]mail.ru)

### Аннотация

Цель исследования – оценить относительный уровень экспрессии гена *BMP-2* у радужной форели разных возрастных групп. Сбор биологического материала проводился на базе Федерального селекционно-генетического центра рыбоводства, расположенного в Ленинградской области. Объектом исследования были образцы тотальной РНК, полученные из разных тканей радужной форели породы рофор. Анализ корреляционных связей относительной экспрессии в ткани прямой кишки показал разнонаправленную зависимость уровня относительной экспрессии гена *BMP-2* с показателями «масса тела» и «высотой тела» у рыб в возрасте 6 мес ( $P < 0,05$ ), а в ткани сердца с показателем длина головы в возрасте 6 мес ( $P < 0,05$ ). По остальным показателям были получены высокие значения коэффициента корреляции ( $r$ ), однако статистически значимых значений не выявлено. Относительный уровень экспрессии гена *BMP-2* в тканях прямого кишечника был незначительным разнонаправленным в группах радужной форели разного возраста. Экспрессионные изменения гена *BMP-2* в тканях сердца показали, что экспрессия непостоянна у рыб разного возраста. В возрасте 6 и 12 месяцев отмечалось снижение уровня экспрессии с его достоверным повышением при достижении рыб возраста 18 месяцев и последующим снижением к возрасту 24 месяцев ( $P < 0,05$  и  $P < 0,01$ ). В результате чего было установлено, что в период активного роста радужной форели породы рофор уровень относительной экспрессии гена *BMP-2* в тканях сердца значительно возрастал у рыб в возрасте 18 месяцев в сравнении с другими возрастными периодами ( $P < 0,05$ ).

**Ключевые слова:** радужная форель, ген, экспрессия, РНК, генетика.

## AN EVALUATION OF RELATIVE EXPRESSION LEVEL OF *BMP-2* GENE IN RAINBOW TROUT AT DIFFERENT AGES

Research article

Shcherbakov Y.S.<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> ORCID : 0000-0001-6434-6287;

<sup>1</sup> All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals, Saint-Petersburg, Russian Federation

\* Corresponding author (yura.10.08.94.94[at]mail.ru)

### Abstract

The aim of the study was to evaluate the relative level of *BMP-2* gene expression in rainbow trout of different age groups. Biological material was collected at the Federal Fish Breeding and Genetic Centre located in Leningrad Oblast. The object of the study were samples of total RNA obtained from different tissues of rainbow trout of the Rofor breed. A correlation analysis of relative expression in rectum tissue showed multidirectional dependence of *BMP-2* gene relative expression level with "body weight" and "body height" parameters in fish at the age of 6 months ( $P < 0.05$ ), and in heart tissue with head length at the age of 6 months ( $P < 0.05$ ). The other indicators showed high correlation coefficient ( $r$ ) values, but no statistically significant values were detected. The relative level of *BMP-2* gene expression in the rectum tissues was not significantly different in rainbow trout groups of different ages. Expression changes of *BMP-2* gene in heart tissues demonstrated that the expression was inconstant in fish of different ages. There was a decrease in expression level at 6 and 12 months of age, with a significant increase when fish reached 18 months of age and a subsequent decrease by 24 months of age ( $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ ). As a result, it was established that during the period of active growth of rainbow trout of the Rofor breed, the level of relative expression of the *BMP-2* gene in heart tissues increased significantly in fish at the age of 18 months compared to other age periods ( $P < 0.05$ ).

**Keywords:** rainbow trout, gene, expression, RNA, genetics.

### Введение

Аквакультура – на данный момент является активно развивающейся отраслью сельского хозяйства. Самым распространённым холодноводным объектом выращивания является радужная форель. Экономически важными показателями для хозяйств являются темпы роста рыбы. Экспрессия генов – процесс, в ходе которого наследственная информация от гена (последовательности нуклеотидов ДНК) преобразуется в функциональный продукт – РНК или белок.

Литературные данные свидетельствуют о том, что регуляторные гены, такие как гены факторов транскрипции и сигнальных молекул, обычно контролируются многими модульными, тканеспецифичными цис-регуляторными

элементами, которые функционируют во время эмбриогенеза [9]. Эти элементы часто находятся далеко от областей кодирования генов и их промоторов. Костные морфогенетические белки (BMPs – bone morphogenetics proteins) участвуют в регуляции многих процессов в онтогенезе, связанных с органогенезом и дифференцировкой тканей. Известны четыре члена семейства BMP: BMP-2, BMP-4, BMP-5 и GDF6, находящихся под контролем отдаленных цис-регуляторных элементов [7].

BMP-2 – костный морфогенетический белок (bone morphogenetic protein) относится к группе факторов роста, которые были открыты благодаря их способности воздействовать на формирование кости и хряща [10]. Костный морфогенетический белок 2 (BMP-2) считается наиболее активным фактором остеогенеза. Он способствует пролиферации и дифференцировке клеток во время восстановления костей, а также индуцирует образование костей и хрящей *in vivo* [2], [8].

Таким образом, поиск сигнальных путей и изучение экспрессии генов рыб расширяет представление о молекулярных механизмах онто- и эмбриогенеза. А исследование семейства генов BMP дает представление о регуляции процессов развития организма при органогенезе, главным образом, формирование костной системы, и открывает перспективу влияния на размер выращиваемых гидробионтов.

### Материалы и методы исследования

Объектом изучения были образцы тотальной РНК радужной форели. Были сформированы 4 группы радужной форели: 6 месяцев, 12 месяцев 18 месяцев и 24 месяца. С рыб были сняты размерно-весовые показатели: масса, длина по Смиту, длина до конца чешуйчатого покрова, длина головы, высота и толщина тела.

Для оценки относительного уровня экспрессии гена *BMP-2* у рыб разного возраста были зафиксированы образцы мышечной ткани, ткани сердца и прямой кишки. Всего было зафиксировано 60 образцов. Образцы помещались в РНК стабилизирующий раствор «Фиксатор IntactRNA для стабилизации РНК в биологических образцах» («Евроген», Россия).

Выделение образцов тотальной РНК проводили с использованием коммерческого набора «ЛИРА+» для выделения РНК, ДНК и белков» («БИОЛАБМИКС», Россия).

Образцы ткани гомогенизировали на приборе Precellys 24 («Bertin», Франция) в присутствии реагента «ЛИРА» и далее следовали протоколу фирмы-производителя. Полученный раствор РНК хранили при температуре -80 °С. Все этапы работы проводили на льду для предотвращения деградации РНК. Концентрацию РНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop 2000 Thermo FS («Thermo Fisher Scientific», США).

Для проведения ОТ-ПЦР-РВ были использованы реагенты коммерческой фирмы «БИОЛАБМИКС» (Россия). Анализировали уровень относительной экспрессии в образцах тканей прямой кишки и сердца. В качестве референсного образца использовался образец тканей мышц.

Таблица 1 - Праймеры для генов домашнего хозяйства и BMP-2

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.136.54.1>

№ п/п	Название	Последовательность
1	<i>G6PD</i>	F- TCAAAGAGGGTTCGGTTTCC G R- ACCCATCCCTCTTCTCTCC
2	<i>BMP-2</i>	F- AGCCACATGAAAGATCCAC CAT R- GTGGGTATTGACGGTGGCA A

Первичную обработку полученных данных при проведении ПЦР-РВ проводили при помощи программы QuantStudio™ Design & Analysis software v1.5.1. Для анализа уровня относительной экспрессии гена BMP-2 в тканях прямой кишки и сердца в качестве референса использовались образцы мышечной ткани. По результатам ПЦР-РВ генов домашнего хозяйства и оценки стабильности их экспрессии в качестве эндогенного контроля был выбран ген домашнего хозяйства *G6PD*. Расчет экспрессионных изменений гена BMP-2 выполняли методом ddCt (delta delta Cycle threshold) [4] по формуле:

$$ddCt = 2((Ct_{G6pd} - Ct_{ref}) - (Ct_{BMP2} - Ct_{ref})) \quad (1)$$

Описательная статистика представлена в виде Mean±SD. Статистическую значимость разницы оценивали путем вычисления критерия Краскела-Уоллиса. Визуализация данных проводилась в программе GraphPad Prism 8. Корреляционный анализ выполнен с применением критерия Спирмена.

### Основные результаты

Анализ уровня экспрессии гена *BMP-2* в тканях прямого кишечника выявил незначительные разнонаправленные изменения в группах радужной форели разного возраста (рисунок 1). Для рыбы в возрастные периоды 12 и 18 месяцев экспрессия гена *BMP-2* была несколько снижена, но достоверных различий не установлено ( $P=0,3393$ ).

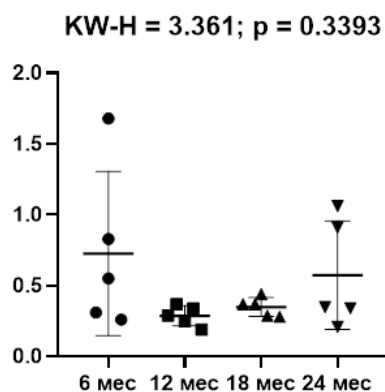


Рисунок 1 - Уровень относительной экспрессии гена *BMP-2* в тканях прямого кишечника у рыб разного возраста  
DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.136.54.2>

Примечание: ось X возраст рыб, ось Y  $2^{-(ddCt)}$  уровень относительной экспрессии гена; KW-H – критерий Краскела-Уоллиса, p-уровень достоверности; данные представлены в виде  $Mean \pm SD$ ; каждая точка на графике отражает уровень экспрессии гена *BMP-2* в отдельном образце ткани прямого кишечника

Анализ корреляционных связей (таблица 2) выявил разнонаправленную зависимость уровня относительной экспрессии гена *BMP-2* в тканях прямого кишечника с показателями «масса тела» и «высотой тела» у рыб в возрасте 6 мес ( $P < 0,05$ ). По остальным показателям были получены высокие значения коэффициента корреляции ( $r$ ), однако статистически значимых значений не выявлено, что видимо, может быть обусловлено особенностями выборки рыб.

Таблица 2 - Корреляционные связи уровня относительной экспрессии гена *BMP-2* в тканях прямого кишечника с некоторыми размерно-весовыми показателям рыб

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.136.54.3>

Показатель	Возраст рыбы			
	6 мес	12 мес	18 мес	24 мес
	$2^{-(ddCt)}$ (пр. киш)			
$2^{-(ddCt)}$ (сердце)	0,667	0,500	-0,154	-0,500
Масса, г	-0,900*	-0,200	0,359	-0,300
Длина по Смигу, см	-0,800	-0,400	0,359	-0,300
Длина тела до конца чешуйчатого покрова, см	-0,800	-0,300	0,359	-0,359
Длина головы, см	-0,527	0,154	0,359	0,700
Высота тела, см	-0,949*	-0,200	0,205	-0,205
Толщина тела, см	-0,211	-0,474	0,395	-0,300
Мышечная масса	-0,700	-0,200	-0,051	-0,400

Примечание: \*  $P < 0,05$

Результаты анализа экспрессионных изменений гена *BMP-2* в тканях сердца показали, что экспрессия не постоянна у рыб разного возраста (рисунок 2). В возрасте 6 и 12 мес. отмечалось снижение уровня экспрессии с его достоверным повышением при достижении рыб возраста 18 мес. и последующим снижением к возрасту 24 мес. ( $P < 0,05$  и  $P < 0,01$ ). Скорее всего у радужной форели в возрасте 18 мес., начинается процесс полового созревания рыбы, а

также активной стадией роста. В группах возраста 12 и 18 мес. по 2 образца РНК деградировали и оценить уровень относительной экспрессии не удалось.

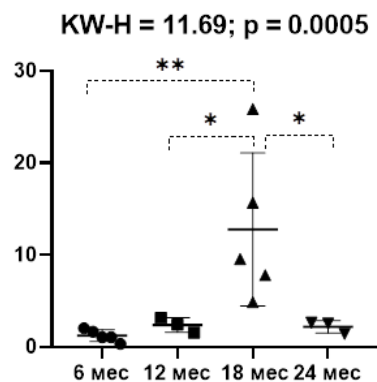


Рисунок 2 - Уровень относительной экспрессии гена BMP-2 в тканях сердца у рыб разного возраста  
DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.136.54.4>

Примечание: ось X возраст рыб, ось Y  $2^{-(ddCt)}$  уровень относительной экспрессии гена; KW-H – критерий Краскела-Уоллиса, p-уровень достоверности; данные представлены в виде  $Mean \pm SD$ ; каждая точка на графике отражает уровень экспрессии гена BMP-2 в отдельном образце ткани сердца; \* -  $P < 0,05$ , \*\* -  $P < 0,01$

Анализ корреляционных связей выявил отрицательную зависимость уровня относительной экспрессии гена BMP-2 с показателем длина головы в возрасте 6 мес ( $P < 0,05$ ). По остальным возрастным группам достоверных значений не выявлено. Установлена положительная взаимосвязь экспрессии анализируемого гена в тканях прямого кишечника и сердца ( $r=0,667$ ), однако показатель не был статистически значим (таблица 3).

Таблица 3 - Корреляционные связи уровня относительной экспрессии гена BMP-2 в тканях сердца с некоторыми размерно-весовыми показателям рыб

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.136.54.5>

Показатель	Возраст рыбы			
	6 мес	12 мес	18 мес	24 мес
	$2^{-(ddCt)}$ (сердце)			
$2^{-(ddCt)}$ (пр. киш)	0,667	0,500	-0,154	-0,500
Масса, г	-0,410	-1,000	-0,400	-0,500
Длина по Смитту, см	-0,564	-0,500	-0,400	-0,500
Длина до конца чешуйчатого покрова, см	-0,564	-0,500	-0,400	-0,500
Длина головы, см	-0,973*	-1,000	-0,600	-0,500
Высота тела, см	-0,649	-1,000	-0,700	-0,500
Толщина тела, см	-0,730	-0,866	-0,462	0,500
Мышечная масса	-0,154	-1,000	-0,200	-0,500

Примечание: \*  $P < 0,05$

Экспрессия гена BMP-2 в различных тканях исследовалась у человека, и различными авторами было отмечено, что наибольшая экспрессия этого гена наблюдалась в мышечных тканях, а также костной и соединительной ткани. В нашем случае были взяты мышечная ткань, ткани сердца и прямой кишки. Полученные нами результаты схожи с результатами экспериментов по оценке уровня экспрессии гена BMP-2 не только у человека, но и у других сельскохозяйственных животных [1], [3], [5], [6].

#### Заключение

Установлено, что в период активного роста радужной форели породы рофор уровень относительной экспрессии гена BMP-2 в тканях сердца значительно возрастал у рыб в возрасте 18 мес в сравнении с другими возрастными периодами ( $P < 0,05$ ).

#### Финансирование

Выполнено при поддержке государственного задания 0445-2021-0010.

#### Конфликт интересов

Не указан.

#### Рецензия

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

#### Funding

The study is carried out with the support of State Assignment 0445-2021-0010.

#### Conflict of Interest

None declared.

#### Review

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

#### Список литературы на английском языке / References in English

1. Fatehi A.N. Expression of Bone Morphogenetic Protein2 (BMP-2), BMP-4 and BMP Receptors in the Bovine Ovary but Absence of Effects of BMP2 and BMP4 during IVM on Bovine Oocyte Nuclear Maturation and Subsequent Embryo Development / A.N. Fatehi // *Theriogenology*. — 2005. — 63. — p. 872-889. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2004.05.013.
2. Li B. Molecular Mechanisms of Intermuscular Bone Development in Fish: a review / B. Li // *Zool Res*. — 2021. — 42. — p. 362-376. DOI: 10.24272/j.issn.2095-8137.2021.044.
3. Li J. Identification and Validation of a Regulatory Mutation Upstream of the BMP2 Gene Associated with Carcass Length in Pigs / J. Li // *Genet Sel Evol*. — 2021. — 94. DOI: 10.1186/s12711-021-00689-0.
4. Livak K.J. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method / K.J. Livak // *Methods*. — 2001. — 25. — p. 402408. DOI: 10.1006/meth.2001.126.
5. Quang Le B. A Biomimetic Collagen-bone Granule-heparan Sulfate Combination Scaffold for BMP2 Delivery / Le B. Quang // *Gene*. — 2021. — 769. — p. 1-19. DOI: 10.1016/j.gene.2020.145217.
6. Usui M. Murine and Chicken Chondrocytes Regulate Osteoclastogenesis by Producing RANKL in Response to BMP2 / M. Usui // *J Bone Miner Res*. — 2008. — 23. — p. 314-325. DOI: 10.1359/jbmr.071025.
7. Yang G. A. Comparative Genomic and Transcriptional Survey Providing Novel Insights into Bone Morphogenetic Protein 2 (bmp2) in Fishes / G. A. Yang // *Int J Mol Sci*. — 2019. — 20. — p. 1-15. DOI: 10.3390/ijms20246137.
8. Zhang W.Z. Characterization and Spatiotemporal Expression Analysis of Nine Bone Morphogenetic Protein Family Genes during Intermuscular Bone Development in Blunt Snout Bream / W.Z. Zhang // *Gene*. — 2018. — 642. — p. 116-124. DOI: 10.1016/j.gene.2017.11.027.
9. Kingsley D.M. The Mouse Short Ear Skeletal Morphogenesis Locus Is Associated with Defects in a Bone Morphogenetic Member of the TGF Beta Superfamily / D.M. Kingsley // *Cell*. — 1992. — 71. — p. 399-410. DOI: 10.1016/0092-8674(92)90510-j.
10. Pregizer S. Control of BMP Gene Expression by Long-range Regulatory Elements / S. Pregizer // *Cytokine Growth Factor Rev*. — 2009. — 20. — p. 509-515. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2009.10.011.