

PCR-RFLP ANALYSE OF HUMAN *LEP* GENE POLYMORPHISM

Zuzana Lieskovská, Anna Trakovická, Anton Kováčik, Nina Moravčíková, Alica Rafayová, Tomáš Minarovič

ABSTRACT

The aim of this work was identification of *LEP* gene polymorphism in the population. Leptin is a product of obese (ob) gene expression that plays a role in energy metabolism and body weight. The human leptin gene is located in the 17 chromosome. The restriction site is located at the position 2549 bp (C→A). The present study included 35 human samples. The average value of BMI was estimate on 24.45. For amplification of specific fragments for *LEP* gene detection the following oligonucleotide primers forward 5' TTTCCTGAATTTTCCCGTGAG 3' and reverse 5' AAAGCAAAGACAGGCATAAAAA 3'. The size of amplified PCR product is 242bp. Subsequently we will use the specific restriction enzyme *HhaI* and expected length of fragments is 181+61 bp in the homozygote CC, 242+181+61 bp in the heterozygote AC and 242 bp in the homozygote AA. We assume that this mutation has connection with human obesity level.

Keywords: human, *LEP*, PCR- RFLP, polymorphism

ÚVOD

Leptín (*LEP*) ako signál pocitu nasýtenia – saturácie tukových zásob organizmu, je produkovaný najmä bunkami bieleho tukového tkaniva, ale bola zistená syntéza leptínu aj v iných tkanivách, napríklad v placentе.

Tukové tkanivo nie je len zásoba nadbytočnej energie. Je to plnohodnotný orgán, ktorý úzko komunikuje s mozgom a zásadne zasahuje do celkového metabolizmu organizmu. Čím je toto tkanivo väčšie, tým viac narušuje fyziologickú rovnováhu vo viacerých systémoch a tým sa stáva rizikovejším pre organizmus ako celok.

Opis leptínu bol publikovaný v roku 1994, ale už v roku 1950 bola popísaná génová mutácia v leptínovom géne (ob gén) u myši, ktorá viedla k rozvoju morbidnej obezity a diabetu už v skorom veku. Leptín má v organizme radu receptorov. Dlhá forma leptínového receptoru má v intracelulárnej doméne 303 aminokyselinových zvyškov, zatiaľ čo krátka forma iba 34. Extracelulárne domény oboch receptorov sú zhodné (Bronsky, Průša, 2008).

Mechanizmus účinku leptínu je známy na centrálnej a periférnej úrovni. Leptín produkovaný bunkami tukového tkaniva sa prostredníctvom väzobných a transportných proteínov dostáva krvným obehom do ventromediálneho jadra (*nucleus ventromedialis*) hypotalamu, kde pomocou receptorov signalizujú dobrú saturáciu tukovými zásobami. Sýtosť leptín signalizuje účinkom na sekréciu neuropeptidu Y, pričom menšia časť leptínu sa dostáva aj do periférnych tkanív (pankreas, pečeň, svalstvo) (Maraček et al., 2004).

Leptín produkt génu *LEP* sa vylučuje najmä v tukovom tkanive, zohráva úlohu ako signál pocitu nasýtenia pre hypotalamus. Expresia a sekrécia leptínu je preukazne korelovaná s reguláciou príjmu potravy, energetickým metabolizmom a hmotnosťou tela (Campfield et al., 1995, Remesar et al., 1997), preto sa *LEP* gén považuje za kandidátny gén pre hrúbku chrbtovej slaniny, spotrebu krmiva a prírastok hmotnosti.

V prípade ľudského *LEP* génu boli popísané dva typy mutácií, pričom polymorfizmus v nekódujúcej 5' oblasti je v asociácii s nižšou koncentráciou leptínu a

tým aj s obéznym fenotypom (Mammés et al., 2000) a diabetom melitus II. typu (Ren et al. 2004).

Táto práca bola zameraná na využitie molekulárno-genetických metód PCR a PCR-RFLP používaných na identifikáciu polymorfizmu kandidátskych génov. Cieľom štúdie bolo identifikovať polymorfizmus *LEP* génu, ktorý môže mať vplyv na *body mass index* (BMI).

MATERIÁL A METODIKA

V experimente sme použili biologický materiál odoberaný od 35 jedincov, z toho žien je 14 a mužov 21. Priemerná hodnota BMI je 24,45. Pre komparatívnu analýzu génov sme použili biologický materiál získaný z krvi ľudských vzoriek. Na izoláciu DNA sme použili klasickú vysolovaciu metódu. Analýzu polymorfizmu *LEP* génu sme uskutočnili metódou PCR. Reakčná zmes pre PCR bola v objeme 25 µl a obsahovala 50ng DNA, 5 U/µl Taq polymerázy (Fermentas), 10 mM dNTP, 25 mM MgCl₂, 1 x Reaction buffer s použitím primerov FOR 5' TTTCCTGAATTTTCCCGTGAG 3' a REV 5' AAAGCAAAGACAGGCATAAAAA 3' podľa Ren et al., (2004). Teplotný a časový profil PCR reakcie bol nasledovný:

Tabuľka 1 Teplotný a časový profil PCR reakcie

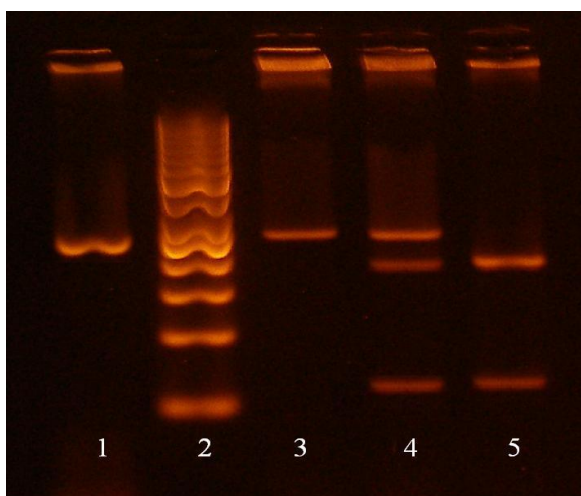
Kroky	LEP	
	Teplota	čas
Štart	94 °C	3 min
Denaturácia	94 °C	45 s
Annealing	60 °C	30 s
Polymerizácia	72 °C	45 s
Elongácia	72 °C	5 min
Ochladenie	15 °C	forever
Počet cyklov	30	

Získané PCR fragmenty sme vizualizovali na 1% agarózovom géle pri 130 V po dobu 30 minút. Na určovanie jednotlivých genotypov sme použili metódu PCR-RFLP použitím špecifickej reštrikčnej endonukleázy *HhaI*. Pri elektroforetickej separácii naštiepených fragmentov sme

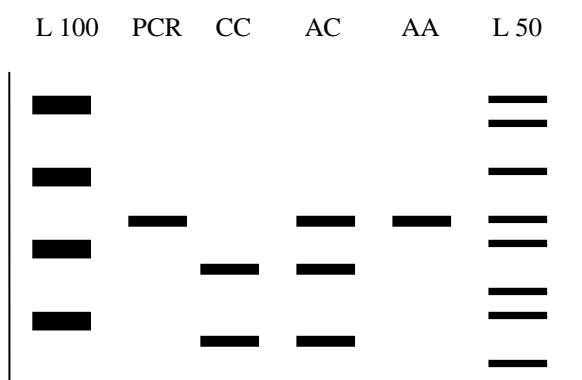
štiepnu zmes nanášali na 2% agarózový gél s prídavkom Gel Red (Biotium) a vizualizovali pod UV transiluminátorom.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

PCR metódou boli identifikované produkty o veľkosti 242bp a následne boli štiepené enzýmom *HhaI* a vizualizované na 2% agarózovom géle. V sledovanej populácii 35 jedincov boli zistené všetky tri genotypy a to genotyp CC 181 a 61 bp (9 jedincov), AC 242, 181 a 61 bp (17 jedincov) a genotyp AA 242 bp (9 jedincov).



Obrázok 1 Štiepenie PCR produktu enzýmom *HhaI*
 Výsledky PCR – RFLP analýzy *LEP* na 2% agarózovom géle
 1 – PCR produkt (242bp), 2 - DNA ladder 50 bp, 3 – genotyp AA (242 bp), 4 – genotyp AC (242bp, 181bp, 61bp), 5 – genotyp CC (181bp, 61bp)



Obrázok 2 Schématické zobrazenie štiepných fragmentov *LEP* génu 242 bp pomocou reštrikčného enzýmu *HhaI*

L100 – DNA ladder 100bp, PCR - PCR produkt (242bp), CC - (181bp, 61bp), AC - (242bp, 181bp, 61bp), AA - (242 bp), L50 – DNA ladder 50bp

Tabuľka 2 Genetická štruktúra - genotypy a frekvencia alel

Gén	Genotypy			Alely	
	AA	AC	CC	A	C
LEP	9 (0,257)	17 (0,486)	9 (0,257)	0,50 ±0,05	0,50 ±0,05

Zistené výsledky pre *LEP* gén korešpondujú s údajmi autora **Ren et al. (2004)**, nakoľko taktiež uvádzajú výskyt alel *Lep^A* (242bp) a *Lep^C* (181 a 61 bp). Naše pozorovania sa odlišili vo frekvenciách alel a genotypov. Kým v nami hodnotenej populácii bola distribúcia genotypov v súlade s rovnovážnym stavom, **Ren et al. (2004)** poukazujú, že vo východoázijskej populácii prevažuje alela C.

Tabuľka 3 Priemerné hodnoty BMI pre *LEP* genotypy

	AA	AC	CC
MUŽI (21)	25,82 ±1,79	24,00 ±2,42	24,60 ±1,75
ŽENY (14)	24,71 ±2,98	23,26 ±3,22	26,10 ±3,65

V testovanej populácii bola potvrdená najväčšia priemerná hodnota BMI u žien s genotypom CC pričom v tomto genotype bola zistená aj nízka smerodajná odchýlka. Podobné zistenia uvádzajú **Vaškú et al. (2006)** a **Ni et al. (2009)** pri ďalšom type mutácie v géne *LEP* v pozícii 2548 A/G.

ZÁVER

Gén *LEP* vykazuje polymorfizmus pri použití reštrikčnej endonuleázy *HhaI*, a tým je možné identifikovať genetické varianty alel A a C. V populácii ľudí sa vyskytujú tri genotypové kombinácie AA, AC a CC a na základe ich distribúcie je možné analyzovať gén leptínu ako marker metabolických porúch. Predpokladáme že genotyp CC je citlivý k zvyšovaniu hmotnosti alebo môže viesť až k obezite.

LITERATÚRA

BRONSKÝ, J., PRŮŠA, R., 2008. Biochemické markery v regulácii nutričného stavu, In: *Klin. Biochem. Metab.*, 16 (37), 2008

CAMPFIELD, L. A., SMITH, F. J., GUISEZ, Y., DEVOS, R., BURN, P., 1995. Recombination mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. In: *Science*, 269, 1995, p. 546–549

MAMMES, O., BETOULLE, D., AUBERT, R., HERBETH, B., SIEST, G., FUMERON, F., 2000. Association of the G2548A polymorphism in the 5' region of the *LEP* gene with overweight. In: *Annals of Human Genetics*, 64, 2000, p. 391–394

MARAČEK, I., STANÍKOVÁ, A., DANKO, J., 2004. Fyziológia leptínu a jeho význam v prevencii porúch plodnosti prežúvavcov. In: *Slovenský chov*, 2004, p. 48

NI, Y.K., SHEK-YI, Y., TIN, L. L., HONG, R.L.L., 2009. Genotyping Candidate Genes Related to Obesity in UCSI University Student Cohort, In: *Journal for the Advancement of Science & Arts*, Vol. 1, January - June 2009, p.29 - 42

REMESAR, X., RAFECAS, I., FERNANDEZ-LOPEZ, J. A., ALEMANY, M., 1997. Leptin. In: *Medicinal Research Reviews*, 17, 1997, p. 225–234

REN, W., ZHANG, SH., WU, J., NI, YX., 2002. Polymorphism of the leptin gene promoter in pedigrees of type 2 diabetes mellitus in Chongqing, China, In: Chinese Medical Journal 2004, 117 (4), p. 558-561

VAŠKŮ, J. A. B., VAŠKŮ, A., DOSTÁLOVÁ, Z., BIENERT, P., 2006. Association of Leptin Genetic polymorphism – 2548 G/A with Gestational Diabetes Mellitus, In: Genes & Nutrition Vol. 1, No. 2, p. 117 - 124

Acknowledgments:

This article was part of the project VEGA 1/0061/10

Contact address:

Ing. Zuzana Lieskovská, Department of Genetics and Breeding Biology, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, Email: z.lieskovska@gmail.com

doc. Ing. Anna Trakovická CSc., Department of Genetics and Breeding Biology, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr.

A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, Email: anna.trakovicka@uniag.sk

Ing. Anton Kováčik, Department of Animal Physiology, Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, Email: anton.kovacik@yahoo.com

Ing. Nina Moravčíková, Department of genetics and breeding biology, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, Email: nina.moravcikova1@gmail.com

Ing. Alica Rafayová PhD., Department of genetics and breeding biology, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, Email: alica.rafayova@gmail.com

Ing. Tomáš Minarovič, Department of genetics and breeding biology, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, Email: tomas.minarovic@azet.sk