

DETECTION OF POLYMORPHISM IN THE BOVINE LEPTIN (*LEP*) GENE BY PCR – RFLP METHOD.

Nina Moravčíková, Anna Trakovická

ABSTRACT

The aim of this work was detect polymorphism in the bovine leptin gene by using PCR – RFLP as a fast and efficient method to genetic analysis of polymorphism. Leptin is a protein, which synthesized by adipose tissue and which plays an important role in the regulation of feed intake, energy metabolism, growth and reproduction of cattle. The polymorphism of leptin gene was studied in a group of 58 bulls of Slovak spotted breed. A strategy employing PCR was used to amplify a 422 bp from blood DNA samples. Digestion of PCR products with restriction enzyme *Sau3AI* revealed two alleles: allele A was 390, 32 fragments and allele B was 303, 88, 32. Three patterns were observed and frequencies were 0.638, 0.328 and 0.034 for AA, AB and BB, respectively. This polymorphism could be further used in other studies to monitor its associations with reproductive traits and evaluated in the marker assisted selection. Leptin controls feed intake and coordinates reproduction, therefore, animals with higher leptin gene expression will probably have lower daily weight gain than others with similar forage offer and nutritional condition and probably will also have longer calving interval.

Keywords: PCR – RFLP, polymorphism, leptin, cattle, reproduction

ÚVOD

Leptín je 16 kDa veľký proteín, syntetizovaný najmä v tukovom tkanive, ovplyvňujúci viacero procesov v organizme. Je zapojený do udržiavania energetickej rovnováhy prostredníctvom regulácie príjmu krmiva a energetického výdaju, v riadení reprodukčných funkcií a imunitnej odpovede (Zhang et al., 1994). Okrem toho sa jeho účinok prejavuje aj v placentе, mliečnej žľaze, kostrových svaloch, mozgu a hypofýze (Passos et al., 2007). Hlavnou funkciou leptínu je informovať centrálny nervový systém o hromadení tuku v tele a kontrolovať príjem krmiva. Počas negatívnej a pozitívnej energetickej bilancie sa hladina leptínu znižuje a zvyšuje (Bartha et al., 2005). Expresia leptínového génu je regulovaná množstvom tukového tkaniva, nutričnou hodnotou krmiva a hormónmi ako je inzulín a rastový hormón (Zhang et al., 1994). Receptory leptínu sú sústredené v oblastiach hypotalamu (Leshin et al., 1994). Vplyv leptínu na reguláciu príjmu krmiva a energetického výdaju, ako aj umiestnenie jeho receptorov indikuje jeho úlohu v rastových procesoch (Barb et al., 1998).

Leptín sa viaže k receptoru lokalizovanom na neuropeptid – Y – neuróne (NPY). NPY má v hypotalame kľúčové postavenie pre integráciu potreby kŕmenia sa s vnútornými signálmi úrovne telesnej energie. Neuropeptid – Y – neurón má význam aj pri kontrole reprodukčných funkcií (Wayne et al., 1995). Predpokladá sa, že leptín dáva signál reprodukčnému systému o dostatku celkovej energie získanej z tukov a o energetických požiadavkách počas gravidity. Môže pomôcť pri regulácii folikulogenézy a steroidogenézy, zároveň slúži ako primárny signál iniciácie puberty alebo aj ako regulátor sexuálnej maturácie (Lindersoon et al., 1998). Duggal et al. (2000) vo svojej práci uviedli, že leptín má rovnako dôležitý vplyv aj na gonády. K jeho expresii dochádza na povrchu folikulárnych buniek vo vaječníku, čo indikuje endokrinný alebo parakrinný účinok leptínu na gonády.

Gén kódujúci leptín bol identifikovaný na bovinom chromozóme 4 (BTA4) a skladá sa z troch exónov a

dvoch intrónov. Iba dva exóny sú prekladané do bielkoviny. Kódujúca oblasť leptínového génu (dĺžka nukleotidu 501) je obsiahnutá v exóne 2 a 3, ktoré sú oddelené intrónom s veľkosťou približne 2 kb. Rozpätie oblasti promotora tohto génu je asi 3 kb (Liefers et al., 2002). Polymorfizmus v kódujúcej oblasti boviného leptínového génu bol asociovaný s príjmom krmiva (Oprzadek et al., 2003), produkciou mlieka (Liefers et al., 2002), telesným tukom (Nkrumah et al., 2005) a reprodukčnými ukazovateľmi (Almeida et al., 2003; Liefers et al., 2002). Podľa Liefers et al. (2005) bolo v géne *LEP* detegovaných 20 polymorfizmov. Ich frekvencia bola 1 na 84 bp v exónových sekvenciách. Pretože 1. exón je nekódujúci, nebol osekvenovaný (Buchanan et al., 2002). V 2. exóne Madeja et al. (2004) popisali na základe dĺžky reštrikčných fragmentov s použitím enzýmu *ClaI* A/T substitúciu, ktorej výsledkom bola zámena tyrozínu na fenylalanín. Buchanan et al. (2002) použitím PCR – RFLP a reštrikčného enzýmu *Kpn2I* detegovali C/T substitúciu a zámenu arginínu na cysteín. V 3. exóne boli identifikované 2 jednonukleotidové polymorfizmy (SNP). Lagonigro et al. (2003) popisujú C/T substitúciu a zámenu valínu za alanín (*NruI*) a Madeja et al. (2004) lokalizovali C/T substitúciu z ktorej vyplýva zámena alanínu na valín s použitím reštrikčného enzýmu *HphI*. V intrónoch bolo identifikovaných viacero polymorfizmov, z nich najznámejšie boli lokalizované pomocou reštrikčných enzýmov *Sau3AI* a *BsaI*.

Polymorfizmus situovaný vo vnútri sekvencie 2. intrónu, zámena C/T, je rozlišovaný pomocou reštrikčného enzýmu *Sau3AI* a dostal pomenovanie *LepSau3AI*. Fragmenty vznikajúce po štiepení týmto reštrikčným enzýmom definujú prítomnosť alel A a B (Kulig, 2005). Liefers et al. (2002) vo svojej práci uvádzajú, že kravy s genotypom AB produkovali v porovnaní s homozygotmi AA viac mlieka, v súvislosti s alelou B zistili sice vyššiu produkciu mlieka ale aj jej negatívny efekt na energetickú rovnováhu a plodnosť. Almeida et al. (2003) zistili, že SNP *LepSau3AI* by mohol mať vplyv na dĺžku medziobdobia kráv a ich hmotnosť pri prvom otelení. Alela A mala tendenciu zvyšovať dĺžku medziobdobia a zároveň aj hmotnosť pri

prvom otelení. Preto by mohla mať selekcia zvierat s určitým genotypom za následok zlepšenie ich zdravotného stavu po otelení. Dĺžka medziobdobia a hmotnosť pri prvom otelení nepriamo vplyvajú na reprodukciu a preto je ťažké určiť či alely *LepSau3AI* priamo pôsobia na reprodukčný systém.

Cieľom našej práce bola analýza genotypovej a alelovej štruktúry *LEP* génu v selektovanej populácii hovädzieho dobytká pomocou metódy PCR – RFLP s následným využitím reštrikčného enzýmu *Sau3AI*.

MATERIÁL A METÓDY

Detekcia polymorfizmu v bovinom leptínovom géne bola vykonaná metódou PCR – RFLP s využitím reštrikčného enzýmu *Sau3AI*. Biologický materiál určený na analýzu bol získaný od 58 plemenných býkov (slovenské strakaté plemeno).

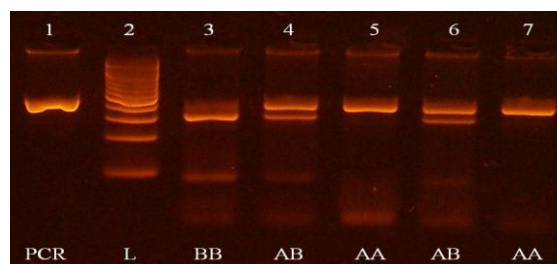
Genómová DNA bola izolovaná pomocou izolačného kitu NucleoSpin Blood (Macherey – Nagel). Postup izolácie bol v súlade s protokolom komerčného kitu. Na amplifikáciu 422 bp dlhého úseku DNA boli použité primery (Liefers et al., 2002): FOR 5' - TGG AGT GGC TTG TTA TTT TCT TCT - 3', REV 5' - GTC CCC GCT TCT GGC TAC CTA ACT - 3'. Reakčná zmes PCR bola pripravená na celkový objem 25 µl a obsahovala: 1 x reakčný pufo, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP Mix, 8 pM *LepSau3AI* primerov (Generi – Biotech), 1 U *Taq* DNA polymerázy (Fermentas), 50 ng templátovej DNA a sterilnú vodu. Amplifikácia prebiehala v termocykléry MJ Mini (Biorad).

Teplotný a časový režim PCR reakcie pozostával zo štartu – 95 °C 5 minút, 35 cyklov (denaturácia – 95 °C 30 sekúnd, annealing – 62 °C 20 sekúnd, polymerizácia – 72 °C 30 sekúnd) a elongácie prebiehajúcej pri 72 °C počas 7 minút.

Naamplifikované PCR produkty boli štiepené reštrikčným enzýmom FastDigest *Sau3AI* (Fermentas) pri teplote 37 °C počas 10 minút. Získané PCR produkty a štiepne fragmenty boli identifikované pomocou elektroforetickej separácie na 2 % agarózovom géle s obsahom interkalačnej farbičky GelRed (Biotium), prebiehajúcej v 0,5 x TBE roztoku pri napätí 130 V po dobu 30 minút a vizualizované pod UV transiluminátorom.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Amplifikované PCR produkty génu *LEP* o veľkosti 422 bp boli štiepené reštrikčným enzýmom *Sau3AI* a vizualizované na 2 % agarózovom géle. Reštrikčným štiepením 422 bp PCR produktu vznikli štiepne fragmenty, ktoré svojou veľkosťou identifikovali prítomnosť konkrétnej alely. V populácii hovädzieho dobytká v celkovom počte 58 plemenných býkov boli zistené všetky tri genotypy a to genotyp AA (390, 32 bp) 37 zvierat, genotyp AB (390 bp, 303 bp, 88 bp, 32 bp) 19 zvierat a genotyp BB (303 bp, 88, 32 bp) 2 zvieratá.



Obrázok 1 Reprezentatívne výsledky PCR – RFLP analýzy SNP *LepSau3AI* na 2 % agarózovom géle 1 – PCR produkt (422 bp), 2 – DNA ladder (100 bp, Fermentas), 3 – genotyp BB (303, 88, 32 bp), 4 – genotyp AB (390, 309, 88, 32 bp), 5 – genotyp AA (390, 32 bp), 6 – genotyp AB (390, 303, 88, 32 bp), 7 - genotyp AA (390, 32 bp)

V hodnotenej populácii býkov mal najväčšie zastúpenie homozygotny genotyp AA a najmenej zastúpený bol genotyp BB. Prevládajúcou bola alela A s frekvenciou 0,8017. Frekvencia alely B bola 0,1983. Pomer alel sa realizoval aj v genotypových kombináciách na základe čoho bola potvrdená vysoká homozygotnosť populácie (0,682). Z dôvodu rozdielu frekvencií sa zrealizovala nižšia premenlivosť v populácii, čomu zodpovedá efektívny počet alel (1,4663). Nízka úroveň polymorfnosti lokusu sa zároveň preniesla do nízkej heterozygotnosti testovanej populácie, v ktorej bolo 31,79 % heterozygotov.

Tabuľka 1 Genotypové a alelové frekvencie SNP *LepSau3AI*

	Frekvencia	Genotypy			Alely	
		AA	AB	BB	A	B
Býky (n=58)	Absolútna	37	19	2	93	23
	Relatívna	0,638	0,328	0,034	0,8017	0,1983

Tabuľka 2 Efektívnosť pôsobenia alel SNP *LepSau3AI*

Lokus	Alely	H _e (1)	PIC(2)	C _a (3)	ENA(4)	V%(5)
<i>LepSau3AI</i>	A: B	0,3179	0,2674	0,682	1,4663	32,36

(1) Heterozygotnosť, (2) polymorfný iníciačný obsah, (3) koeficient homozygotnosti, (4) efektívny počet alel, (5) stupeň realizácie možnej premenlivosti

Podobne vysokú frekvenciu alely A (0,805) ako v nami analyzovanej populácii zistila aj Kulig (2005) pri analýze 860 poľských čiernostrakatých kráv. Liefers et al. (2002) zistili v populácii 631 holštajnsko – frízskych kráv prevahu genotyp AA s frekvenciou 0,813 nad genotypom AB (0,185) a genotyp BB (0,002). Podobne aj Javanmard et al. (2010) uvádzajú v populácii 66 holštajnských býkov značnú prevahu alely A (0,90). Passos et al. (2007) zistili taktiež vysokú prevahu alely A (0,91) v populácii 126 kráv rôznych plemien zameraných na mäsovú úžitkovosť. Príčinou odlišností vznikajúcich vo frekvenciách výskytu jednotlivých alel a genotypov je jednak veľkosť analyzovanej populácie a ďalej sú to rozdiely medzi plemenami pri ktorých došlo k identifikácii *LepSau3AI* polymorfizmu. Podľa Pompa et al. (1997) sa frekvencie zistené na základe PCR – RFLP v bovinom géne *LEP* odlišujú medzi plemenami s pôvodom *Bos taurus* a *Bos*

indicus, čo by mohlo byť príčinou niektorých fenotypových rozdielov.

ZÁVER

Pomocou metódy PCR – RFLP sme identifikovali všetky tri genotypy jednonukleotidového polymorfizmu *LepSau3AI* vznikajúceho v 2. intróne bovinného leptínového génu. V selektovanej populácii 58 plemenných býkov sme zistili všetky tri genotypy a to genotyp AA 37 zvierat, genotyp AB 19 zvierat a genotyp BB 2 zvieratá. Najväčšie zastúpenie mala alela A s frekvenciou výskytu 0,817. Na základe prezentovaných výsledkov môžeme povedať, že metóda PCR – RFLP je rýchlou a efektívnou pre detekciu polymorfizmu *LepSau3AI*.

LITERATÚRA

ALMEIDA, S. E. M., ALMEIDA, E. A., MORAES, J. C. F., WEIMER, T. A. 2003. Molecular markers in the LEP gene and reproductive performance of beef cattle. In *J. Anim. Breed. Genet.*, vol. 120, 2003, no. 2, p. 106-113.

BARB, C. R., YAN, X., AZAIN, M. J., KRAELING, R. R., RAMPACEK, G. B., RAMSAY, T. G. 1998. Recombinant porcine leptin reduces feed intake and stimulates growth hormone secretion in swine. In *Domest. Anim. Endocrinol.*, vol. 15, 1998, no. 1, p. 77-86.

BARTHA, T., SAYED-AHMEDA, A., RUDAS, P. 2005. Expression of leptin and its receptors in various tissues of ruminants. In *Domest. Anim. Endocrinol.*, vol. 29, 2005, no.1, p. 193-202.

BUCHANAN, F. C., FITZSIMMONS, C. J., VAN KESSEL, A. G., THUE, T. D., WINKELMAN-SIM, D. C., SCHMUTZ, S. M. 2002. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. In *Genet. Sel. Evol.*, vol. 34, 2002, no.1, p. 105-116.

DUGGAL, P. S., VAN DER HOEK, K. H., MILNER, C. R., RYAN, N. K., ARMSTRONG, D. T., MAGOFFIN, D. A., NORMAN, R. J. 2000. The in vivo and in vitro effects of exogenous leptin on ovulation in the rat. In *Endocrinology*, vol. 141, 2000, no. 6, p. 1971-1976.

JAVANMARD, A., KHALEDI, K., ASADZADEH, N., SOLIMANIFARJAM, A. R. 2010. Detection of Polymorphisms in the Bovine Leptin (LEP) Gene: Association of a Single Nucleotide Polymorphism With Breeding Value of Milk Traits in Iranian Holstein Cattle. In *Journal of Molecular Genetics*, vol. 2, 2010, no. 1, p. 10-14.

KULIG, H. 2005. Association between leptin combined genotypes and milk performance traits of Polish Black-and-White cows. In *Arch. Tierz.*, vol. 48, 2005, no. 6, p. 547-554.

LAGONIGRO, R., WIENER, P., PILLA, F., WOOLLIAMS, J. A., WILLIAMS, J. L. 2003. A new mutation in the coding region of the bovine leptin gene associated with feed intake. In *Anim. Genet.*, vol. 34, 2003, no. 5, p. 371-374.

LESHIN, L. S., BARB, C. R., KISER, T. E., RMPACEK, G. B., KRAELING, R. R. 1994. Growth hormone-releasing hormone and somatostatin neurons within the porcine and bovine hypothalamus. In *Neuroendocrinology*, vol. 59, 1994, no. 3, p. 251-264.

LIEFERS, S. C., PAS, M. F. W., VEERKAMP, R. F., VAN DER LENDE, T. 2002. Associations between Leptin

Gene Polymorphisms and Production, Live Weight, Energy Balance, Feed Intake, and Fertility in Holstein Heifers. In *J. Dairy. Sci.*, vol. 85, 2002, no. 6, p. 1633-1638.

LIEFERS, S. C., VEERKAMP, R. F., TE PAS, M. F., CHILLIARD, Y., VAN DER LENDE, T. 2005. Genetics and physiology of leptin in periparturient dairy cows. In *Domest. Anim. Endocrinol.*, vol. 29, 2005, no. 1, p. 227-238.

LINDERSOON, M., ANDERSSON-EKLUND, L., KONING, D. J., LUNDEN, A., MAKI-TANILA, A., ANDERSSON, L. 1998. Mapping of serum amylase-1 and quantitative trait loci for milk production traits to cattle chromosome 4. In *J. Dairy. Sci.*, vol. 81, 1998, no. 5, p. 1454-1461.

MADEJA, Z., ADAMOWICZ, T., CHMURZYNSKA, A., JANKOWSKI, T., MELONEK, J., SWITONSKI, M., STRABEL, T. 2004. Short communication: effect of leptin gene polymorphisms on breeding value for milk production traits. In *J. Dairy Sci.*, vol. 87, 2004, no. 11, p. 3925-3927.

NKRUMAH, J. D., LI, C., YU, J., HANSEN, C., KEISLER, D. H., MOORE, S. S. 2005. Polymorphisms in the bovine leptin promoter associated with serum leptin concentration, growth, feed intake, feeding behavior, and measures of carcass merit. In *J. Anim. Sci.*, vol. 83, 2005, no.1, p. 20-28.

OPRZADEK, J., FLISIKOWSKI, K., ZWIERZCHOWSKI, L., DYMNIKI, E. 2003. Polymorphisms at loci of leptin (LEP), Pit1 and STAT5A and their association with growth, feed conversion and carcass quality in Black and White bulls. In *Anim. Sci. Papers and Rep.*, vol. 21, 2003, p. 135-145.

PASSOS, D. T., HEPP, D., MORAES, J. C. F., WEIMER, T. A. 2007. Effect of polymorphisms linked to LEP gene on its expression on adipose tissues in beef cattle. In *J. Anim. Breed. Genet.*, vol. 124, 2007, no. 3, p. 157-162.

POMP, D., ZOU, T., CLUTTER, A. C., BARENDSE, W. 1997. Rapid communication: mapping of leptin to bovine chromosome 4 by linkage analysis of a PCR-based polymorphism. In *J. Anim. Sci.*, vol. 75, 1997, no. 5, p. 1427

WAYNE, J., KUENZEL, W. J., FRALEY, G. S. 1995. Neuropeptid Y: It's in the Neural Regulation of Reproductive Function and Feed Intake in Mammalian Species. In *Poultry Avian Biol. Rev.*, vol. 6, 1995, no. 3, p. 185-209.

ZHANG, Y., PROENCA, R., MAFFEI, M., BARONE, M., LEOPOLD, L., FRIEDMAN, J. M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. In *Nature*, vol. 372, 1994, p. 425-432.

Pod'akovanie:

Práca vznikla s podporou projektu VEGA „Genetické hodnotenie produkcie a kvality mäsa v špeciálnych odvetviach živočíšnej výroby“. Registračné číslo projektu: 1/0061/10.

Kontaktná adresa:

Ing. Nina Moravčíková, Department of Genetics and Breeding Biology, Faculty of Agrobiology and Food Resources, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, Email: nina.moravcikova@gmail.com

Doc. Ing. Anna Trakovická, CSc., Department of Genetics and Breeding Biology, Faculty of Agrobiology and Food Resources, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, Email: anna.trakovicka@uniag.sk