ANALYSIS OF *SERPINE1* GENE VARIABILITY IN PIGS

Weisz F., Knoll A.

Department of Animal Morphology, Physiology and Genetics, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, Zemedelska 1, 613 00, Brno, Czech Republic

E-mail: filipw@seznam.cz

ABSTRACT

SERPINE1 gene encodes for plasminogen activator inhibitor-1 *(PAI-1)* which plays a key role in incidence of thrombosis and atherosclerosis in human. Porcine *SERPINE1* or *PAI-1* gene is localised on porcine chromosom 3 near to QTL for fatness. The aim of study was to describe genetic structure and polymorphisms of intron 3 and CDS of *SERPINE1* gene in pigs. In our study we seguenced intron 3 and deposited the sequence to EMBL (accession number FN396538.1).

Thank comparative sequencig of intron 3 in breed Meishan, Wild Boar and Piétrain we found 15 SNPs and 1 indel. For next study FN396538:g.566G>A was chosen. SNP was determined in 98 pigs Czech Large White breed by MbiI PCR-RFLP and frequencies of allele A and G were 0.66 and 0.34, respectively. The association study with FN396538:g.566G>A and production traits (average daily gain, backfat thickness, lean meat content) was proceeded but no significant difference between genotypes of SNP and analysed traits was found.

In next part we have sequenced cDNA of *SERPINE1* gene from 2 pigs breed Meishan and 2 pigs Wild Boar. We have observed 5 SNPs in CDS and 1 of them changes amino acid in protein structure. Consequently we have sequenced this SNP summary from 15 Czech Large White, 15 Wild Boar, 15 Duroc, 15 Landrace and 12 Piétrain pigs. The SNP which changes amino acid in protein structure will be examined in next part of our study.

This gene is very important in human medicine and it is associated with obesity and fat deposition. One reason why we can study this gene is its function and effect for human. On the other hand our results may be used for linkage mapping of porcine chromosome 3 and detected polymorphisms will be used for more extensive association study with fat deposition in pigs.

Key words: *SERPINE1*, *PAI-1*, SNP, pig

Acknowledgments: This work was supported by Czech Science Foundation (Project No. 523/07/0353).

ÚVOD

Gen *SERPINE1* kóduje inhibitor aktivátoru plasminogenu typu 1 (PAI-1), jež je nedílnou součástí regulace fibrinolytického systému a mimo jiné má důležitou roli i v remodelaci a přestavbě extracelulární matrix, s čímž souvisí i účast PAI-1 při takových procesech jakými jsou zánět, nádorová invaze, trombóza či ateroskleróza (Bijnens *et al*., 1997; Johnsen *et al*, 1998).

PAI-1, neboli *SERPINE1*, je 50 kDa velký glykoprotein obsahující 379 až 381 aminokyselin a především díky své unikátní konformační flexibilitě patří do serpinové proteinové rodiny (Correia and Haynes, 2006; Bijnens *et al*., 1997). Hlavními producenty tohoto proteinu jsou endoteliální buňky a buňky hladké svaloviny; tento inhibitor je však produkován i trombocyty, hepatocyty, makrofágy či v tukové tkáni (Correia and Haynes, 2006). V nízké koncentraci se tento inhibitor vyskytuje u všech jedinců, ale jeho úroveň v plazmě se zvyšuje s vlivem některých onemocnění a u člověka slouží tento protein k predikci výskytu počátečních fází diabetes typu 2, obezity či infarktu myokardu (Crandall *et al*., 2006).

Humánní gen *SERPINE1* či *PAI-1* byl lokalizován na chromozomu 7q21.3-q22. V oblasti promotoru byl u tohoto genu nalezen polymorfismus *4G/5G*, jehož *4G* varianta vede je zvýšené transkripci PAI-1 proteinu a tím i ke zvýšenému riziku vzniku trombózy či infarktu myokardu v důsledku snížené aktivity fibrinolytického systému (Bučková, 2002; Correia and Haynes, 2006).

Gen *SERPINE1* u prasat byl lokalizován na SSC3 v blízkosti QTL pro ukládání tuku. Tento gen je tedy zkoumán i u prasat, jež jsou velmi vhodnými modelovými organismy pro člověka, z hlediska jeho asociace s ukládáním tuku a následným vznikem obezity. Výsledky takovýchto studií jsou využitelné nejenom v chovu a šlechtění prasat, ale i pro případné další zkoumání v humánní medicíně.

MATERIÁL A METODIKA

V první části jsem se zaměřili na nalezení a osekvenování intronu 3. Gen *SERPINE1* byl částečně klonován pomocí PCR s primery navrženými na základě RNA sekvence NM_213910 a následně sekvenován. Díky získané sekvenci byly navrženy primery pro sekvenování intronu 3 (přímý primer 5´-CCG TGG AAC AAA GAT GAG AT-3´ a zpětný primer 5´-GCA CTC ACC ACC GCC TC-3´). PCR byla prováděna na teplotním cykleru GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems). Teplotní profil PCR byl následující: počáteční denaturace 95 °C / 2 min., 30 cyklů – denaturace 95 °C / 45s, annealing 54 °C / 30 s, elongace 68 °C / 40 s, závěrečná elongace 68 °C / 7 min. Složení PCR reakce je uvedeno v tab. 1; PCR produkt byl očekávané délky 1268 bp.

Tab. 1 Složení PCR

Složení reakční směsi	koncentrace
DNA	50 ng
specifický přímý primer	0,2 μM
specifický zpětný primer	0,2 μM
dNTPs mix	200 μM
PCR pufr kompletní	10x
LA polymeráza	1U
celkový objem reakce	25 μl

Komparativním sekvenováním PCR fragmentů 3 jedinců plemene meishan, 3 divokých prasat a 3 jedinců plemene piétrain byly nalezeny polymorfizmy intronu 3 daného genu pomocí programu ClustalW2 2.0.8. Detekované SNP FN396538:g.566G>A bylo genotypováno u 98 prasat plemene české bílé ušlechtilé pomocí *Mbi*I PCR-RFLP (přímý primer 5´-TCC AGC ATC CTC TTC TCC AT AG-3´ a zpětný primer 5´-CCT TCC TTC CTC TCT CTC TCT T-3´), složení reakční směsi je v tab. 1. V případě alely *A*, která neobsahuje restrikční místo pro enzym *Mbi*I, zůstává PCR produkt dlouhý 648 bp a v případě alely *G* obsahující štěpné místo byl štěpen na 2 fragmenty o délce 292 a 356 bp. Separace fragmentů DNA byla provedena pomocí 2% agarózového gelu s ethidium bromidem. Po vizualizaci pod UV-světlem byly odečteny jednotlivé genotypy.

V druhé části práce byla provedena asociační analýzu stanoveného FN396538:g.566G>A polymorfizmu u souboru 98 prasat plemene české bílé ušlechtilé. Statistická analýza byla provedena pomocí GLM modelu SAS/STAT verze 9.1.4. Asociované produkční znaky byly následující: výška hřbetního tuku, přírůstek od narození a podíl hlavních masitých částí. Do modelové rovnice byly zahrnuty následující efekty:

$$Y_{ijk} = \mu + Serp_i + roknar_j + e_{ijk}$$

Y_{ijk} = pozorovaná hodnota

μ = průměr,

$Serp_i$ = pevný efekt genotypu polymorfizmu FN396538:g.566G>A (A, A/G, G)

$roknar_j$ = efekt roku narození

e_{ijk}= náhodná reziduální chyba

V třetí části práce jsme se zaměřili na komparativní sekvenování cDNA genu *SERPINE1* u 2 jedinců plemen duroc a dvou jedinců plemene meishan. Pro amplifikaci specifického úseku genu pomocí PCR byly navrženy primery (přímý primer 5´ – ATT GAG TCG CCA GCC AGT TAC – 3´, a zpětný primer 5´– TGA GGT CTA AGA GGC AGA TTC G – 3´). PCR byla prováděna na teplotním cykleru GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems). Složení reakční směsi viz. tab. 1. Teplotní profil PCR byl následující: počáteční denaturace 95 °C / 2 min., 30 cyklů - denaturace 95 °C / 45 s,

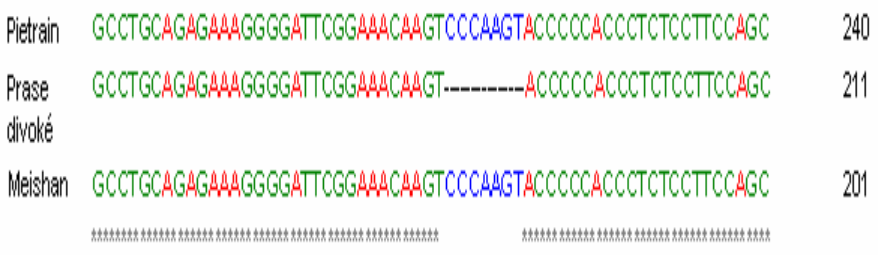
annealing 58,2 °C / 30 s, elongace 68 °C / 40 s, závěrečná elongace 68 °C / 7 min. PCR produkt délky 1419 bp a obsahující celou CDS byl sekvenován pomocí BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit a přístroje ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Pro sekvenování bylo použito stejných primerů jako pro PCR.

Dle získané sekvence byly navrženy primery (přímý primer - 5´ - GGT TTC ATG CCC TAC TTC TTC A – 3´ a zpětný primer 5´ - GAG TGC TTT TCT CTG GGA AGG – 3´) pro stanovení námi vybraných nových polymorfizmů z celogenomové DNA, které jsou obsaženy v CDS. Teplotní profil PCR byl následující: počáteční denaturace 95 °C / 2 min., 32 cyklů - denaturace 95 °C / 45s, annealing 58,2 °C / 30 s, elongace 68 °C / 40 s, závěrečná elongace 68 °C / 7 min. Složení reakční směsi je uvedeno v tab. 1. PCR produkt měl délku 1188 bp a byl sekvenován pomocí BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit a přístroje ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Bylo sekvenováno 15 jedinců plemene bílé ušlechtilé, 15 divokých prasat, 15 jedinců plemene duroc, 15 jedinců plemene landrace, 12 jedinců plemene piétrain; vyhodnocení sekvencí bylo provedeno v programu SeqScape 2.1 (Applied Biosystems).

VÝSLEDKY A DISKUZE:

Byla osekvenována část genu *SERPINE1*, jehož délka je 1268 bp a tato sekvence byla vložena do databáze EMBL (FN396538.1); sekvence obsahuje i nově nalezený intron 3 (956 bp), který se nachází od mezi exony 3 a 4 (od 185 do 1140bp) . Při komparativním sekvenování tohoto intronu u prasat plemene meishan, piétrain a divokého prasete bylo nalezeno celkem 15 polymorfizmů (14 SNP a 1 indel, který se vyskytoval pouze v mínus variantě u divokých prasat viz. obr. 1.).

Obr.1 - indel polymorfizmus

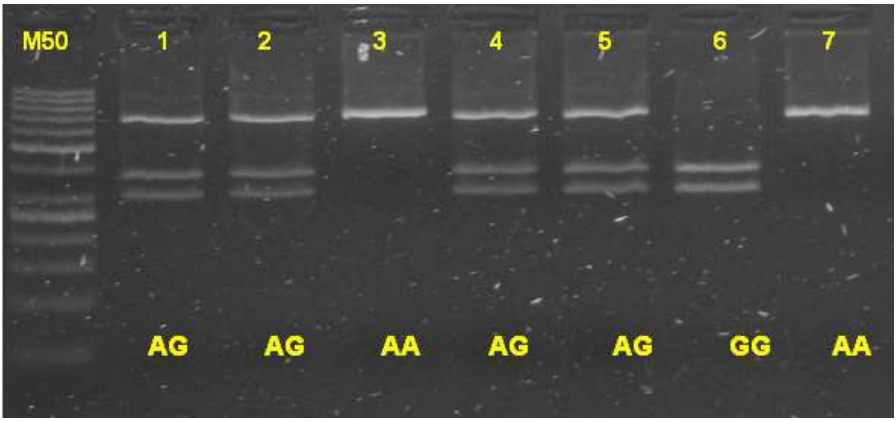


Pro další studium bylo vybráno SNP FN396538:g.566G>A, jehož alela *A* byla byla nalezena u plemene piétrain a u divokého prasete a alela *G* byla detekována u meishana. Byly zjištěny následující frekvence: alela *A* 0.66 a alela *G* 0.34 viz. tab. 2, obr. 2.

Tab.2 Frekvence genotypů MbiI PCR-RFL

Serpine genotyp	absolutní četnost	relativní četnost
AA	43	0,44
AB	43	0,44
BB	12	0,12

Obr. 2- Genotypy MbiI PCR-RFL



U plemene české bílé ušlechtilé byla provedena asociační analýza s užitkovými vlastnostmi prasat. U tohoto plemene nebyly zjištěny žádné statisticky průkazné rozdíly mezi testovanými genotypy a uvedenými vlastnostmi.

Dále bylo provedeno sekvenování cDNA u 2 jedinců plemene meishan a 2 jedinců divokého prasete. Při vzájemném porovnání sekvencí bylo nalezeno 5 SNPs v CDS, z nichž 1 SNP mění aminokyselinu ve výsledné bílkovině. Jedná se o záměnu valinu za isoleucin. Další 3 SNPs mají jiný nukleotid než referenční sekvence NM_213910 viz.tab. 3. Pro poznání variability SNP měnícího aminokyselinu i u jiných plemen prasat byla sekvenována DNA jedinců různých plemen (české bílé ušlechtilé, prase divoké, duroc, landrace, piétrain). Při této analýze bylo použito celogenomové DNA, byl tedy opět nalezen i indel intronu 3, který byl polymorfní pouze u divokého prasete, u ostatních plemen se vyskytoval pouze v plus variantě. Výsledky této analýzy viz.tab. 3 a 4.

Tab.3 SPNs v CDS genu SERPINE1

	SNP pozice v NM_213910 / pozice v CDS	Triplet	výsledná AK
Vzorek	187/50		
Referenční sekvence	C	A**C**C	**Thr**
Divočák	T	A**T**C	**Ile**
Meishan	T	A**T**C	**Ile**
Vzorek	284/147		
Referenční sekvence	C	GC**C**	**Ala**
Divočák	C	GC**C**	**Ala**
Meishan	Y	GC**Y**	**Ala**
Vzorek	581/444		
Referenční sekvence	C	GA**T**	**Asp**
Divočák	T	GA**C**	**Asp**
Meishan	T	GA**C**	**Asp**
Vzorek	612/475		
Referenční sekvence	A	**A**TC	**Ile**
Divočák	G	**G**TC	**Val**
Meishan	A	**A**TC	**Ile**
Vzorek	737/600		
Referenční sekvence	G	AC**G**	**Thr**
Divočák	G	AC**G**	**Thr**
Meishan	R	AC**R**	**Thr**
Vzorek	929/792		
Referenční sekvence	C	TA**C**	**Tyr**
Divočák	C	TA**C**	**Tyr**
Meishan	T	TA**T**	**Tyr**
Vzorek	1155/1018		
Referenční sekvence	A	**A**TG	**Met**
Divočák	G	**G**TG	**Val**
Meishan	G	**G**TG	**Val**
Vzorek	1219/1082		
Referenční sekvence	C	T**C**T	**Ser**
Divočák	Y	T**Y**T	**Phe, Ser**
Meishan	C	T**C**T	**Ser**

Y= C nebo T; R= G nebo A

Tab. 4 Frekvence genotypů SNP měnícího aminokyselinu

Plemeno	A	A/G	G
duroc	0,2	0,4	0,4
landrace	0	0,13	0,87
bílé ušlechtilé	0,27	0,6	0,13
prase divoké	0,13	0,13	0,74
piétrain	0,17	0,58	0,25

ZÁVĚR

Tato práce jako jedna z prvních mapuje část genu *SERPINE1* a snaží se nalézt asociaci mezi tímto genem a produkčními vlastnosti prasat. I když nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi genotypy námi testovaného SNP (FN396538:g.566G>A) a sledovanými znaky, neznamená to, že tento gen

nehraje důležitou roli při ukládání tuku. Kromě jmenovaného SNP bylo nalezeno velké množství polymorfizmů, včetně SNP, jež má za následek změnu aminokyseliny ve výsledné bílkovině. Tento gen je významně spojován v humánní medicíně s obezitou a nejen proto bude výzkum genu *SERPINE1* dále pokračovat ve spolupráci s AV ČR VÚŽFG Liběchov**.**

LITERATURA

BUČKOVÁ, DANA. *et al*. Polymorphism 4G/5G in the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene is associated with IgE-mediated allergic diseases and asthma in the Czech population. *Allergy*, 2002, vol. 57, no. 5, p. 447-449.

BIJNENS, A.P. *et al*. Expression and characterization of recombinant porcine plasminogen activator inhibitor-1. *Thrombosis and Haemostasis*, 1997, vol.77, p. 350-356.

CLUSTALW, 2.0.8 [online]. [cit. 21. 11. 2008]. Dostupné z: http://www.ebi.ac.uk/clustalw/

CORREIA, M.J.G., HAYNES, W.G. A role for plasminogen activator inhibitor-1 in obesity: from Pie to PAI? *Arteriosclerosis, Thromobosis and Vascular Biology*, 2006, vol. 26, p. 2183-2185.

CRANDALL, D.L. *et al*. Modulation of adipopse tissue development by pharmacological inhibition of PAI-1. *Arteriosclerosis, Thromobosis and Vascular Biology*, 2006, vol. 26, p. 2209-2215.

EMBL databáze – Genomická DNA *SERPINE1* [online]. [cit. 22. 5. 2009]. Dostupné z : http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+[EMBL:FN396538]+-newId

JOHNSEN M. *et al*. Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation. *Current Opinion in Cell Biology*,1998, vol.10, p.667-671.

NCBI databáze – mRNA *SERPINE1* (Gene ID: 396945) [online]. [cit. 30. 10. 2008]. Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/47522667

SAS Institute Inc. 2004. SAS 9.1.4. Cary, NC