

Polimorfizmus keresése a szarvasmarha hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid 5. exonjában

¹Csikós Ádám – ¹Simon Ádám – ¹Homonai Krisztina – ¹Gulyás Gabriella – ¹Tisza Ákos – ²Tamás Andrea – ²Reglődi Dóra – ¹Jávor András – ¹Czeglédi Levente

¹Debreceni Egyetem, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar, Állattudományi, Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézet, Debrecen

²Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Anatómiai Intézet, Pécs
czegledi@agr.unideb.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid egy elsődlegesen hipotalamuszban termelődő, e mellett számos szövetben előforduló neuropeptid, melynek a szervezet működésében betöltött sokrétű élettani funkciója bizonyítást nyert. A szarvasmarha fajban leírt nagyszámú PACAP SNP között előfordul olyan, melynek fenotípusos hatását igazolták. Munkánk során magyar szürke, magyar tarka, holstein-fríz, charolais és angus fajtákban kerestük az 5. exon polimorfizmusát, a korábban leírt G/A tranzícióra, illetve az 1–391 bp szakasz egyéb SNP-ire. A PCR RFLP és a PCR SSCP vizsgálatok során nem igazoltuk sem a G/A tranzíció és egyéb leírt SNP jelenlétét, illetve egyetlen unikális konformert sem találtunk.

Kulcsszavak: PACAP, szarvasmarha, polimorfizmus

SUMMARY

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a neuropeptide expressed primarily in the hypothalamus and in other tissues, which divergent and extensive physiological functions are proved. Large number of SNPs in PACAP are published involved SNP that is associated with phenotypic trait of cattle as well. Hungarian Grey, Hungarian Simmental, Holstein, Charolais and Angus cattle breeds were involved in this study to search for polymorphism in exon 5 1–391 bp and G/A transition. Our results of PCR RFLP and PCR SSCP did not prove the occurrence neither G/A transition, nor any other SNP in cattle breeds involved.

Keywords: PACAP, cattle, polymorphism

BEVEZETÉS

A PACAP (hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid) egy elsősorban hipotalamuszban termelődő neuropeptid, melyet legelőször juhból izoláltak. Elnevezése onnan ered, hogy a vizsgálatok során olyan polipeptidként találták meg, amely a hipofízisben az adenilát-cikláz aktivitását stimulálta (Miyata et al., 1989). Az állati szervezetben két aktív formája van jelen, a 27 aminosavból álló PACAP27 és a tizenegy aminosavval hosszabb PACAP38. A két peptid mennyiségi jelenléte a szövetekben eltérő, főként a PACAP38 expresszálódik nagyobb mennyiségben (Arimura et al., 1991).

A PACAP eddig leírt szerepe igen sokrétű, számos olyan mennyiségi tulajdonság kifejeződését befolyásolja közvetetten, melyek alapján az állati termék-előállítás egyik alapvető biológiai markereként értékelhetjük. A PACAP in vivo, illetve sejtkultúrában a növekedési hormon és a luteinizáló hormon termelődését serkenti (Miyata et al., 1989). A gasztrointesztinális traktusban is megtalálható. Leírt hatása, hogy befolyásolja a bélmotilitást (Münger et al., 1992) és jelenléte serkenti a gyomor szekrécióját (Ozawa et al., 1997). Szaporodásbiológiában betöltött szerepét erősíti, hogy a herében nagy mennyiségben van jelen (Shioda et al., 1994), nőivarú állatoknál petefészek sejtekben és a nem-i szervek simaizomszövetének működésében betöltött szerepe bizonyított (Fahrenkrug et al., 1996; Shioda et al., 1996).

Szarvasmarhában kimutatott PACAP SNP-ről igazolták, hogy hatással van a tehének élősúlyára és a törzshosszra (Ruijie et al., 2010). A mesterséges plazma PACAP koncentráció emelés hatását vizsgálva Radcliff et al. (2001) azt tapasztalták, hogy a holstein-fríz ökröknél az intravénásan adagolt PACAP szabályozza a növekedési hormon termelődését.

Munkánk során célul tűztük ki, hogy a szarvasmarha PACAP génjének 5. exonjában korábban leírt SNP-t hazánkban tenyésztett fajtákban keressük, illetve mutáció detektálási eljárással megvizsgáljuk az említett régiót.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Állatok

A vizsgálatokat magyar szürke, magyar tarka, holstein-fríz, charolais és angus szarvasmarha fajtákkal végeztük. Az állatoktól szőrhagymát gyűjtöttünk, illetve állatorvosi célból vett vérminta állt rendelkezésünkre. A munka során fajtánként 12 egyeddel végeztük a vizsgálatokat.

DNS izolálás vérből

1,5 ml-es mikrocentrifuga csövekbe 500 µl vérmósoló oldatot (10 mM Tris, 0,2 mM EDTA, pH 7,6) mérünk, majd az egyes vérmintákból 50 µl-t adtunk hozzá.

Az összemért mintákat 30 másodpercig vortexeltük, ezt követően 12000 rpm fordulaton, 2 percig centrifugáltuk, a felülszót előntöttük. Az eddigi lépéseket kétszer megismételtük, további vérminta hozzáadása nélkül. Ezt követően a mintákhoz 100 µl lízis puffert (10 mM KCl; 1,5 M MgCl₂; 10 mM Tris pH 7,4) és proteázt (Sigma) adtunk, majd 37 °C-on és 1 órán keresztül inkubáltuk, végül az enzimet inaktívtá tettük 95 °C-on 10 percig. A minták DNS koncentrációját NanoDrop 1000 spektrofotométerrel határoztuk meg, illetve 2 m/v%-os agaróz elektroforézissel ellenőriztük. A mintákat további felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

DNS izolálás szőrhagymából

1,5 ml-es mikrocentrifuga csövekben 3–10 szőrhagymát inkubáltunk proteináz K enzimet (Sigma) tartalmazó lízis pufferral (1,25 v/v% Tween 20, 1× PCR puffer) 60 percig 60 °C-on. A minták DNS koncentrációját NanoDrop 1000 spektrofotométerrel határoztuk meg, illetve 2 m/v%-os agaróz elektroforézissel ellenőriztük. Az így nyert genomális DNS mintákat -20 °C-on tároltuk a további vizsgálatig.

Polimeráz láncreakció (PCR) és agaróz gélelektroforézis

Vizsgálataink során öt szarvasmarhafajta esetében PCR reakció alkalmazásával szaporítottuk fel az elemezni kívánt DNS szakaszt. Ez a szarvasmarha 24. kromoszómáján található PACAP gén 5. exonjának 1–391 bp hosszúságú szakaszt jelenti. Ezen szakaszon belül a 33. pozícióban korábbi kínai eredmények a qinchuan fajta esetében egy G/A tranzíció jelenlétét mutatták ki (Ruijie et al., 2010). Annak megállapítására, hogy a jellemzően hazánkban is tartott fajták hordozzák-e ezt a mutációt PCR-restrikciós fragmenthossz polimorfizmus vizsgálatot végeztünk. A vizsgált DNS szakasz szekvenciájának Ensembl Genome Browser adatbázis azonosítója: ENSBTAG00000020650. A primereket az OligoAnalyzer online programmal terveztük meg az 5. exonra és a Sigma Aldrich állította elő. Az oligók szekvenciája, forward: 5' CGACCCCTCTCCTTGCAAG 3' és reverse: 5' GCATTCTCTAGTGCTTCGT 3'. A PCR mix összetétele 15 µl reakcióközegre vonatkoztatva: 1× DreamTaq puffer (Thermo Scientific), 150 µM dNTP (Fermentas), 2 mM MgCl₂, 0,1 µM E5F1 (forward) primer, 0,1 µM E5R1 (reverse) primer, 0,5 U DreamTaq polimeráz, desztillált víz. Az alkalmazott PCR program paraméterei: kezdeti denaturáció 95 °C, 1,5 perc; denaturáció 95 °C, 0,5 perc; primer tapadás 63 °C, 0,5 perc; szintézis 72 °C, 0,5 perc; végső szintézis 72 °C, 5 perc. A ciklusok száma 35 volt. A keletkező PCR terméket agaróz gélelektroforézis alkalmazásával ellenőriztük. A felhasznált gél 2 m/v%-os volt (1× TAE puffer, 4V/cm feszültség mellett), amit GelRed (Biotium, USA) DNS festékkel festettünk. A kapott DNS mintázatokat UV fény segítségével tettük láthatóvá (UVIpro Platinum), és számítógép segítségével dokumentáltuk.

PCR-restrikciós fragmenthossz polimorfizmus

A felszaporított 391 bp hosszú szakaszt restriktív enzim hasításnak vetettük alá. Az alkalmazott enzim a TseI. (New England Biolabs) volt, amelynek hasítóhelye: 5' G | CWGC 3'. A restriktív emésztési elegy összetétele 15 µl reakcióközegben: 5 U TseI. restriktív enzim; 1× CutSmart puffer; 6 µl PCR termék; kiegészítve desztillált vízzel. Az emésztés 1 órán keresztül 65 °C-on zajlott BioRad PTC-200 típusú készülékben. A keletkezett fragmenteket agaróz gélelektroforézis segítségével választottuk el egymástól 3 m/v%-os agaróz gélen (1× TAE puffer, 4V/cm feszültség mellett), a gél GelRed (Biotium, USA) DNS festékkel festettük.

PCR-egyszálú DNS konformáció polimorfizmus

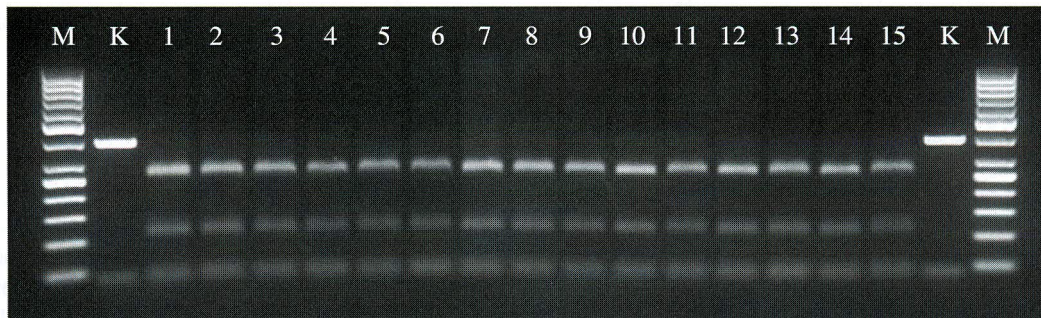
A PCR-egyszálú DNS konformáció polimorfizmus vizsgálat során a korábbiakban leírt módon felszaporított PCR terméket hőkezeléses denaturálással egyszálúsítottuk formamid jelenlétében. A közeg összetétele 22 µl reakcióközegre vonatkoztatva: 1,6 µl brómfenol-kék/xilén-cianol festék; 18,4 µl formamid és 2 µl PCR termék. Az összeállított elegyet 95 °C-on inkubáltuk 5 percen át, majd azonnal jégre helyeztük a mintákat. Az egyszálúsított mintákat nem-denaturáló poliakrilamid gélen konformációjuk alapján választottuk el egymástól. A poliakrilamid gél összetétele 40 ml-ben a következő volt: 0,07× TBE (Tris-borát-EDTA, pH 8,3; Sigma) puffer, 10 m/v%-os 49:1 arányú akrilamid-biszakrilamid (Sigma), 5 v/v glicerin (Sigma), 0,001 v/v%-os ammónium-persulfát (Sigma), 0,0001 v/v%-os TEMED (Sigma), desztillált vízzel kiegészítve. A poliakrilamid gélelektroforézist a PROTEAN® II xi Cell (BioRad) elektroforézis készülékkel végeztük. Az elektroforézis állandó hőmérsékletét VWR 1160S termosztát biztosította. A 160×200×0,75 mm méretű poliakrilamid gélre PowerPac™ Universal (BioRad) tápegység segítségével minden esetben 20V/cm állandó feszültséget kapcsolunk. Az elektroforézis időtartama 10 óra volt. Az elektroforézist követően a konformáció szerint szeparált DNS sávokat ezüstfestéssel tettük láthatóvá Benbouza et al. (2006) módszere alapján.

EREDMÉNYEK

PCR-restrikciós fragmenthossz polimorfizmus

A PCR reakció során felszaporított 391 bp nagyságú DNS régiót restriktív enzim hasításnak vetettük alá. Ruijie et al. (2010) az ötödik exon 33. pozíciójában egy olyan G/A tranzíció jelenlétét mutatták ki, mely hatást gyakorol az állat fenotípusára. Vizsgálatunkban az alkalmazott TseI. enzim az amplifikált 391 bp hosszúságú szakaszt a leírt mutáció hiányában 33, 107 és 251 bp nagyságú fragmentumokra hasítja, míg a mutáció jelenlétében 140 és 251 bp nagyságú fragmentek jönnek létre. Mind az öt vizsgált fajtánál ugyanazt a genotípust detektáltuk (1. ábra), azaz az emésztés után három fragmentumot kaptunk, ami a leírt mutáció hiányára utal.

1. ábra: Szarvasmarha PACAP 5. exonjának PCR RFLP elemzése G/A tranzícióra



Megjegyzés: mintasorrend: M. 50 bp DNS létra, K. Pozitív kontroll, 1–3. magyar szürke, 4–6. magyar tarka, 7–9. holstein-fríz, 10–12. charolais, 13–15. angus

Figure 1: PCR RFLP analyses of PACAP exon 5 G/A transition in cattle

Note: samples: M: DNA ladder, K: positive control, 1–3. Hungarian Grey, 4–6. Hungarian Simmental, 7–9. Holstein, 10–12. Charolais, 13–15. Angus

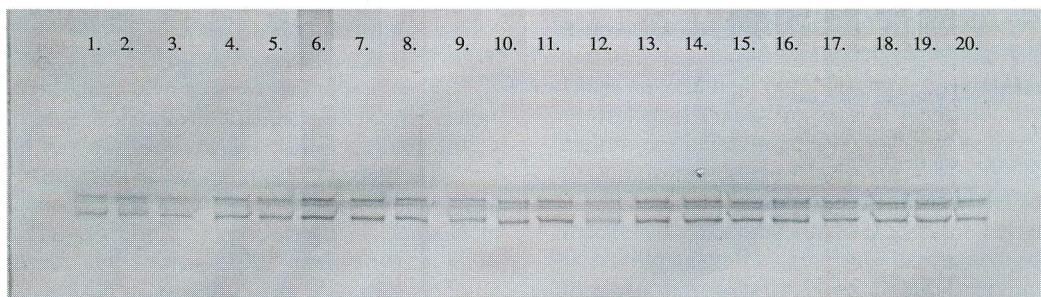
PCR-egyszálú DNS konformáció polimorfizmus

A PCR reakció során amplifikált DNS szakaszokat magas hőmérsékleten, formamid jelenlétében denaturáltuk, így egyszálúvá tettük a DNS-t a konformáció polimorfizmus vizsgálathoz. A 2. ábra mutatja be fajtánként 4 egyeddel (n=12 egyed/fajta a teljes vizsgálat) az SSCP akrilamid gél mintázatát.

A gélen minden minta esetében két diszkrét sáv figyelhető meg, amely a denaturált duplaszálú DNS egy-egy szálát jelenti, viszont eltérő konformációban. A kapott eredmény minden egyed esetében ugyanaz volt, eltérés a keletkezett mintázatokban nem volt kimutat-

ható, ami a PCR-RFLP vizsgálattal együtt azt igazolja, hogy a vizsgált állományokban nem tapasztalható polimorfizmus. Az SSCP egy meghatározott fragmentméretig igen magas határfokkal detektál, akár egy bázis eltérést is a PCR termékek között. Gyakran előfordul, hogy egy egyed SSCP gélképe kettőnél több sávot tartalmaz, ennek oka, hogy ugyanazon szekvenca több konformer formájában jelentkezhet, és bizonyos sávok intenzitása, vagyis a konformer mennyiségi jelenléte nagy variabilitást mutat. Az ilyen alacsony részarányban esetlegesen megjelenő sávok detektálását az 1 pg DNS/mm² érzékenységu ezüstfestés biztosította.

2. ábra: Szarvasmarha PACAP 5. exon PCR-SSCP vizsgálatának poliakrilamid gélelektroforetikus eredménye



Megjegyzés: mintasorrend: 1–4. magyar szürke, 5–8. magyar tarka, 9–12. holstein-fríz, 13–16. charolais, 17–20. angus

Figure 2: PCR SSCP polyacrylamide gel electrophoresis of PACAP exon 5 in cattle

Note: samples: 1–4. Hungarian Grey, 5–8. Hungarian Simmental, 9–12. Holstein, 13–16. Charolais, 17–20. Angus

KÖVETKEZTETÉSEK

A szarvasmarha 24. kromoszómáján található a hipofízis eredetű adenilát-cikláz aktiváló polipeptidet kódoló gén, mely 5 exont tartalmaz. Az exonok mérete 630, 111, 132, 96, 1668 bp. A génről két variáns íródik át, a variánsok 176 és 174 aminosavból épülnek fel. Szarvasmarha esetében az Ensembl Genome Browser adatbázis 1722 SNP-t tartalmaz a PACAP gén vonatkozásában figyelembe véve az exonokat és az intronokat is, az 1722 SNP megközelítőleg 61%-a, 1062 SNP nem

kódoló régióban, intronban található. Az 5. exon PCR reakcióban felszaporított 391 bp nagyságú vizsgált szakasza 43 leírt SNP-t tartalmaz az említett adatbázisban. Ezen mutációk közül 17 missense, 1 samesense, 25 pedig a 3' nem átíródo régióba (3' UTR) esik. A 43 SNP közül mindössze egy, az általunk is vizsgált tranzíció (rs478999045) volt összefüggésbe hozható értékmérő tulajdonságok megjelenésével. Az rs478999045 SNP kapcsolatba hozható a qinchuan marha esetében a testhossz, a marmagasság, a testsúly, a szív körméret és a szív nagyságának az alakulásával. Három genotípus

különíthető el: AA, AB és BB. Az AA és AB genotípusok az említett tulajdonságok esetében nagyobb méretet eredményeznek, mint a BB genotípus, vagyis a mutáció homozigóta formája (Ruijie et al., 2010).

A jelenlegi vizsgálatunkban a kínai qinchuan szarvasmarhafajta PACAP gén 5. exonjában található G/A tranzíció hiányát mutattuk ki magyar szürke, magyar tarka, charolais, angus és a tejhasznosításban domináns holstein-fríz fajták esetében. A PCR-RFLP módszerrel kapott fragmenthossz mintázatok igazolták az említett mutáció hiányát, e mellett a PCR-SSCP módszer sem eredményezett konformáció eltérést az egyszálú DNS fragmenteknél, így polimorfizmust nem tapasztaltunk.

A terveink között szerepel továbbá a PACAP gén 5. exonján kívül minden kódoló régió vizsgálata a költséghatékony SNP detektáló SSCP módszer alkalmazá-

sával, annak megállapítására, hogy a vizsgálatba vont fajtáknál jelen van-e polimorfizmus, illetve az összefüggésbe hozható-e hús-, illetve tejhasznosítású fajtáknál meghatározó értékmerő tulajdonsággal.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Czeglédi Levente, Tamás Andrea publikációt megalapozó kutatása a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése országos program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

IRODALOM

- Arimura, A.–Somogyvári-Vígh, A.–Miyata, A.–Mizuno, K.–Coy, D. H.–Kitada, C. (1991): Tissue distribution of PACAP determined by RIA: Highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology*. 129: 2778–2789.
- Benbouza, H.–Jacquemin, J. M.–Baudoin, J. P.–Mergeai, G. (2006): Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. 10: 77–81.
- Fahrenkrug, J.–Steenstrup, B. R.–Hannibal, J.–Alm, P.–Ottesen, B. (1996): Role of PACAP in the female reproductive organs. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 805: 394–407.
- Miyata, A.–Arimura, A.–Dahl, R. R.–Minamino, N.–Uehara, A. Jiang, L.–Culler, M. D.–Coy, D. H. (1989): Isolation of a novel 38 residue hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 164: 567–574.
- Münger, Z.–Arimura, A.–Ertan, A.–Rossowski, W. J.–Coy, D. H. (1992): Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide relaxes rat gastrointestinal smooth muscle. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 27: 375–380.
- Ozawa, M.–Aono, M.–Mizuta, K.–Moriga, M.–Okuma, M. (1997): Central administration of PACAP stimulates gastric secretion mediated through the vagal pathway in anesthetized rats. *Digestive Diseases and Sciences*. 42: 2552–2559.
- Radcliff, R. P.–Lookingland, K. J.–Chapin, L. T.–Tucker, H. A. (2001): Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces secretion of growth hormone in cattle. *Domestic Animal Endocrinology*. 21: 187–196.
- Ruijie, H.–Linsen, Z.–Hongbao, W.–Xiaobai, Z.–Linsheng, G.–Xianlin, Z. (2010): Effect of G3909A mutation in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide gene (PACAP) on the partial growth traits in qinchuan cattle. *Journal of Agricultural Biotechnology*. 18: 719–724.
- Shioda, S.–Legradi, G.–Leung, W. C.–Nakajo, S.–Nakaya, K.–Arimura, A. (1994): Localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its messenger ribonucleic acid in the rat testis by light and electron microscopic immunocytochemistry and in situ hybridization. *Endocrinology*. 135: 818–825.
- Shioda, S.–Nakai, Y.–Nakajo, S.–Nakaya, K.–Arimura, A. (1996): Localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its type I receptors in the rat ovary: immunohistochemistry and in situ hybridization. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 805: 677–683.