

ANALYSIS OF *EEF1A1* GENE VARIABILITY IN PIGS

ANALÝZA VARIABILITY GENU *EEF1A1* U PRASAT

Svobodová K., Knoll A.

Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

E-mail: xsvobo21@node.mendelu.cz, knoll@mendelu.cz

ABSTRACT

The aim of this work is to analyse gene variability of eukaryotic elongation factor (*EEF1A1*) in pigs. *EEF1A1* is a multifunctional protein. First of all, this protein plays an important role in protein biosynthesis in eukaryotic cells. However, its over-expression can be connected with tumour development. Variability of *EEF1A1* gene is tested in several pig breeds by polymerase chain reaction (PCR) and sequencing. Suitable primers were designed, PCR was optimised, and sequencing of exon 2 (partial), complete intron 2, exon 3, intron 3 and major fragment of exon 4 were performed. This segment has 799 bp, of which 195 bp and 121 bp make intron 2 and intron 3, respectively. The selected breeds were tested: Czech Large White, Landrasse, Pietrain and crossbred of Pietrain and Meishan. No polymorphism has been found yet. The polymorphism is expected to be found in intron 1, which length is suspected to be more than 1000 bp. Following research will be focused on this intron.

Key words: *EEF1A1*, pig, variability

This work was supported by CSF project No. 523/03/H076 and 523/06/1302.

ABSTRAKT

Cílem této práce je analyzovat variabilitu v genu pro eukaryotický elongační faktor (*EEF1A1*) u prasat. *EEF1A1* je multifunkční protein. V eukaryotních buňkách má důležitou roli především při syntéze bílkovin, jeho zvýšená exprese však může být také spojena s rozvojem zhoubných nádorů. Variabilita genu *EEF1A1* je pomocí metody polymerázová řetězová reakce (PCR) a následného sekvenování sledována u vzorků několika plemen prasat. Byly navrženy vhodné primery, optimalizována PCR a provedeno sekvenování oblasti skládající se z části exonu 2, celého intronu 2, exonu 3, intronu 3 a převážné části exonu 4. Tato oblast obsahuje celkem 799 bp, z toho 195 bp tvoří druhý a 121 bp třetí intron. Testováno bylo plemeno české bílé ušlechtilé, landrasse, pietrain a kříženec plemen pietrain a meishan. V celém úseku zatím nebyl nalezen polymorfismus. Další práce bude spočívat v testování oblasti prvního exonu a hlavně intronu, u kterého je očekávána délka až tisíců párů bazí. Nalezení polymorfismu v tomto úseku DNA je proto pravděpodobnější.

Klíčová slova: *EEF1A1*, prase, variabilita

ÚVOD

Eukaryotický elongační faktor 1 A (EEF1A) hraje důležitou roli při syntéze bílkovin v eukaryotických buňkách (MERRICK, 1992). U savců se EEF1A vyskytuje ve dvou izoformách – EEF1A1 a EEF1A2. Tyto dvě izoformy vykazují na úrovni aminokyselin 92% podobnost (KNUDSEN *et al.*, 1993), jsou však rozdílně exprimovány. EEF1A1 je přítomna po celou dobu vývoje a s výjimkou dospělé kosterní svaloviny je exprimována ve všech tkáních, EEF1A2 je vývojově regulována a je exprimována pouze v buňkách svaloviny a v neuronech (LEE *et al.*, 1992; KNUDSEN *et al.*, 1993).

EEF1A1 má kromě své úlohy při translaci (EJIRI, 2002) ještě další funkce. Má například souvislost se stavbou buněčné kostry (CONDEELIS, 1995). Zvýšená exprese EEF1A1 je také spojována s rozvojem tumorů (THORNTON *et al.*, 2003). DITZEL *et al.* (2000) identifikovali EEF1A1 jako autoprotilátku u 66 % pacientů s Feltyho syndromem.

EEF1A1 byl u člověka zmapována na šestý chromozom, oblast 6q14 (LUND *et al.*, 1996). U prasete byl gen *EEF1A1* pomocí radiačního hybridního mapování nalezen na osmém chromozomu, oblast 8q11 (KARNUAH *et al.*, 2001).

MATERIÁL A METODIKA

Byla otestována plemena české bílé ušlechtilé (vzorek T4), landrasse (vzorek T9), pietrain (vzorek P108) a kříženec plemen meishan a pietrain (vzorek M222).

Dle srovnání sekvence cDNA prasečího *EEF1A1* genu (získané subtraktivním klonováním na VÚŽFG Liběchov) a lidské sekvence DNA tohoto genu (ENST00000309286, Ensembl) byla určena poloha a velikost jednotlivých exonů v prasečí sekvenci. Pro amplifikaci specifického úseku genu (zahrnuje intron 2 a 3) pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) byly navrženy primery:



PCR byla prováděna na teplotním cykleru GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems). Složení reakční směsi bylo následující: lyzát DNA, deionizovaná voda, 10 × LA PCR pufr complete (500mM Tris-HCl, pH 9,3 (25 °C), 150 mM (NH₄)₂SO₄, 22,5 mM MgCl₂, 1% Tween 20, Top-Bio), dNTP (F. Hoffmann-La Roche Ltd.), specifické primery (10 pmol/μl), LA DNA polymeráza (5 U/μl, Top-Bio). Celkový objem reakce – 25 μl.

Teplotní profil PCR: poč. denat. 95 °C / 2 min., 30 cyklů – denaturace 95 °C / 20 s, annealing 60 °C / 20 s, elongace 68 °C / 60 – 90 s, závěrečná elongace 68 °C / 7 min.

Kontrola reakce proběhla elektroforézou na 2% agarosovém gelu (Serva) s přidavkem EtBr při 100 V po dobu 40 minut. Po vizualizaci pod UV-světlem byly pomocí markeru GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (MBI Fermentas) určeny délky vzniklých fragmentů.

Sekvenování bylo provedeno pomocí BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit a přístroje ABI PRISM 3100-*Avant* Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Na porovnávání jednotlivých sekvencí byl použit program ClustalW.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Dle lidské sekvence genu *EEF1A1* byla očekávána délka ampifikovaného fragmentu 974 bp. Výsledné PCR produkty však byly o něco kratší, jejich velikost byla asi 900 bp (Obr. 1).

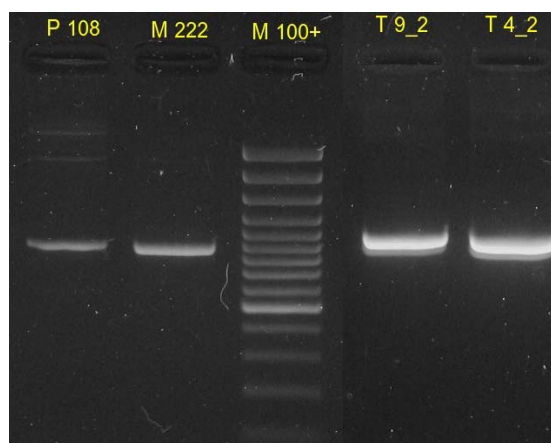
Následné sekvenování prokázalo, že u prasete mají introny 2 a 3 ve srovnání s lidskou sekvencí odlišnou délku – intron 2 zahrnuje 195 bp (u člověka 366 bp), intron 3 pak 121 bp (u člověka 108).

Celkově se tedy podařilo sekvenovat úseky o délce 799 bp u vzorku T4, 796 bp u vzorků T9 a M222 a 804 bp u vzorku P108.

Při srovnávání těchto fragmentů nebyl nalezen polymorfismus.

Získané úseky byly dále porovnávány s částečnou sekvencí prasečí mRNA genu *EEF1A1* dostupnou v databázi NCBI (Gene ID: 574059). Toto srovnání prokázalo pouze jedinou odlišnost, a to ve 39. nukleotidu třetího exonu, kde se v námi testovaných vzorcích nachází cytozin, kdežto v mRNA z databáze NCBI je uveden tymin (Obr 2).

Obr. 1 PCR produkty u jednotlivých plemen



Pozn. P108 – pietrain, M222 – pietrain×meishan
T9 – landrasse, T4 – české bílé ušlechtilé

Obr. 2 Porovnání části exonu 3, ve které byla nalezena odlišnost

M222	ATGGGAAAGGGCTCCTTCAAGTATGCCTGGGTCTTGGACAAACTAAAGGCTGAACGTGAGCGTGGTA
P108	ATGGGAAAGGGCTCCTTCAAGTATGCCTGGGTCTTGGACAAACTAAAGGCTGAACGTGAGCGTGGTA
T4	ATGGGAAAGGGCTCCTTCAAGTATGCCTGGGTCTTGGACAAACTAAAGGCTGAACGTGAGCGTGGTA
T9	ATGGGAAAGGGCTCCTTCAAGTATGCCTGGGTCTTGGACAAACTAAAGGCTGAACGTGAGCGTGGTA
mRNA	-----TGCCTGGGTCTTGGAACTAAAGGCTGAACGTGAGCGTGGTA

ZÁVĚR

Fragment genu *EEF1A1* zahrnující část exonu 2, intron 2, exon 3, intron 3 a převážnou část exonu 4 byl úspěšně amplifikován a sekvenován u čtyř plemen prasat. V celém analyzovaném úseku nebyl nalezen polymorfismus.

Práce bude tedy pokračovat testováním oblasti, která zahrnuje první intron. Protože velikost tohoto fragmentu se očekává až v tisících párů bází, bude nejprve třeba optimalizovat podmínky PCR. Následné nalezení polymorfismu v tomto úseku DNA je však právě díky jeho délce pravděpodobnější.

Tato práce byla podpořena granty GAČR 523/03/H076 a 523/06/1302.

LITERATURA

CLUSTALW [online]. [cit. 20. 9. 2006]. Dostupné z: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>

Condeelis, J. (1995): Elongation factor 1a, translation and the cytoskeleton. *Trends Biochem. Sci.*, 20: 169–170.

Ditzel, H. J.; Masaki, Y.; Nielsen, H.; Farnaes, L.; Burton, D. R. (2000): Cloning and expression of a novel human antibody--antigen pair associated with Felty's syndrome. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 97: 9234-9239.

Ejiri, S. (2002): Moonlighting functions of polypeptide elongation factor 1: from actin bundling to zinc finger protein R1-associated nuclear localization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66: 1–21.

ENSEMBL databáze – transkript ENST00000309286 [online]. [cit. 8. 7. 2006]. Dostupné z: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/exonview?db=core;transcript=ENST00000309268

Karnuah, A.B., Uenishi, H., Kiuchi, S., Kojima, M., Onishi, A., Yasue, H., and Mitsuhashi, T. (2001): Assignment of 64 genes expressed in 28-day-old pig embryo to radiation hybrid map. *Mamm. Genome*, 12: 518–523.

Knudsen, S.M. et al. (1993): Tissue-dependent variation in the expression of elongation factor-1a isoforms: isolation and characterisation of a cDNA encoding a novel variant of human elongation-factor 1a. *Eur. J. Biochem.*, 215: 549–554.

Lee, S. et al. (1992): Tissue-specific expression in mammalian brain, heart, and muscle of S1, a member of the elongation factor-1 alpha gene family. *J. Biol. Chem.*, 267: 24064–24068.

Lund, A.; Knudsen, S. M.; Vissing, H.; Clark, B.; Tommerup, N. (1996): Assignment of human elongation factor 1-alpha genes: *EEF1A* maps to chromosome 6q14 and *EEF1A2* to 20q13.3. *Genomics*, 36: 359-361.

Merrick, W. C. (1992): Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiol. Rev.*, 56: 291–315.

NCBI databáze – mRNA *EEF1A1* (Gene ID: 574059) [online]. [cit. 20. 9. 2006]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=Nucleotide&dopt=GenBank&val=68124033>

Thornton, S. et al. (2003) Not just for housekeeping: protein initiation and elongation factors in cell growth and tumorigenesis. *J. Mol. Med.*, 81: 536–548.