

# DETECTION OF VISFATIN (PBEF1) GENE POLYMORPHISM IN PIGS

## DETEKCE POLYMORFISMU V GENU VISFATIN (*PBEF1*) U PRASAT

**Zrůstová J., 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: xzrustov@node.mendelu.cz, knoll@mendelu.cz

---

### ABSTRACT

The aim of this work is to find out polymorphism in visfatin gene (*PBEF1*) which name is abbreviation of „visceral fat“. Visfatin was identified as an adipokinine which is preferably secreted from visceral adipose tissue. Subcutaneous adipose tissues produce visfatin only in small amount. When obesity occurs, visfatin concentration is increased. Visfatin exerts insulin-mimetic effects in various tissues – decreases the glucose level in blood. Polymerase chain reaction (PCR) and following sequencing were used for determination of visfatin variability at several samples of pig breeds (the Czech Large White, Landrasse, Pietrain and crossbred of Pietrain and Meishan). The variability was found out after design of suitable primers, after PCR optimization and sequencing of two introns (between exons 5, 6 and 9, 10). By use of Webcutter software, the suitable restriction enzymes were found out. Genotyping was performed by using restriction fragment–length polymorphism (RFLP) with the selected restriction enzymes.

**Key words:** visfatin, variability, pig

*This work was supported by CSF project No. 523/03/H076 and 523/04/0106.*

### ABSTRAKT

Cílem této práce je nalézt polymorfismy v genu visfatin (*PBEF1*), jehož název vznikl zkrácením slovního spojení „visceral fat“ („tuk uložený v útrokách“). Visfatin je přednostně syntetizován ve viscerálním tuku a jen v malé míře je produkován v tuku podkožním. Při obezitě se koncentrace visfatinu zvyšuje. Visfatin se chová podobně jako inzulín – snižuje hladinu glukózy v krvi. Ke stanovení variability genu visfatin byla použita polymerázová řetězová reakce (PCR) a následné sekvenování u vzorků několika plemen prasat (české bílé ušlechtilé, landrasse, pietrain a kříženec plemen pietrain a meishan). Po navržení vhodných primerů, optimalizaci PCR a sekvenování dvou intronů (mezi exonem 5 a 6 a exonem 9 a 10) byla nalezena variabilita. Pomocí programu Webcutter byly vyhledány vhodné restriční endonukleázy, které byly použity při štěpení vybraných polymorfismů metodou polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP).

**Klíčová slova:** visfatin, variabilita, prase

*Tato práce byla podpořena granty GAČR 523/03/H076 a 523/04/0106.*

## ÚVOD

Visfatin je gen kódující protein, který je adipokinem uvolňujícím se do krevního řečiště a má mnoho funkcí jako například podporování dozrávání buněk srdeční hladké svaloviny a inhibice neutrofilní apoptózy. Také aktivuje insulinový receptor a chová se jako inzulin, snižuje hladinu glukózy v krvi a zvyšuje citlivost na inzulin ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=full\\_report&list\\_uids=10135](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=10135)). Tento protein se vysoce exprimuje ve viscerálním tuku a byl získán jako faktor, který podporuje růst prekurzorů B lymfocytů a nedávno bylo zjištěno, že se chová jako insulinový faktor (El-Eter et al., 2006). Visfatin známý také jako PBEF (pre-B cell colony-enhancing factor) je cytokinin, jehož hladina v krvi souvisí s obezitou. Je považován za nového člena velké skupiny adipokininů, kam patří také leptin a adiponektin (Fukuhara, 2005). Pochopení této skupiny může být důležité pro rozvoj nových terapií nemocí, které souvisí s obezitou (Tilg a Moschen, 2006). Lokalizace genu visfatin u člověka je na 7. chr q 22.2 ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=full\\_report&list\\_uids=10135](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=10135)) a podle komparativní mapy se u prasete vyskytuje na 9. chromozomu (<http://www.toulouse.inra.fr/lgc/pig/compare/SSCHTML/SSC9S.HTM>).

Cílem naší práce bylo nalézt a testovat SNPs (single nucleotide polymorphisms) v referenčním souboru různých plemen prasat (české bílé ušlechtilé, landrasse, pietrain a kříženec plemen pietrain a meishan).

## MATERIÁL A METODIKA

V Ensembl databázi jsme vyhledali lidskou sekvenci genu visfatin ([http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/exonview?db=core;transcript=ENST00000222553](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/exonview?db=core;transcript=ENST00000222553)) a pomocí programu ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) ji porovnali s prasečí sekvencí (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=77404427>) a odvodili tak rozmístění a velikost exonů v prasečí sekvenci. Pomocí primerů navržených ve VÚŽFG Liběchov (přímý ATG TGT GGG GTT TCT TTG TGT a zpětný GCC ATG TTT TAT TTG CTG ATT) jsme u plemen prasat české bílé ušlechtilé, landrasse a pietrain amplifikovali fragment o velikosti 490 pb, sekvenovali jej (ABI PRISM 3100) a porovnali získané sekvence jednotlivých plemen mezi sebou a také s komparativní sekvencí z databáze Ensembl. Polymorfismy ve zkoumaných exonech nebyly nalezeny, proto jsme vybrali dva nejkratší introny z lidské sekvence a podle jejich umístění jsme navrhli nové primery v koncové části exonů, mezi kterými se nacházely. Přímý TGG CCA CAA ATT CTA GAG AGC A a zpětný primer AAA TGA GCA GAT GCC CCT ATG amplifikovaly intron mezi exonem 5 a 6; přímý primer TCT GGT GGA GCT TTG CTA CAG A a zpětný GCA ACT GGG TCC TTG AAG ACA amplifikovaly intron mezi exonem 9 a 10. Produkty PCR byly sekvenovány, sekvence byly opět porovnány a polymorfismy byly nalezeny v obou intronech. Za pomoci programu Webcutter (<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>) jsme vyhledali vhodné restriční enzymy (Hpa II a Bse DI), které štěpí sekvenci v místě polymorfismů. Z důvodu mnoha štěpných míst vybraných restričních enzymů v sekvenci, musely být navrženy nové primery (přímý GGG TCA TAA CTT GAC TTT GGA GAA a zpětný TCT AGA GAA CCT

GAA GAG AGC AGA A), které amplifikovaly pouze úsek obsahující dvě nebo tři štěpná místa. Následně pomocí metody RFLP využívající restriční enzymy byla genotypována plemena prasat (české bílé ušlechtilé, landrasse, pietrain a kříženec plemen pietrain a meishan). V intronu mezi exonem 9 a 10 se objevila repetice, takže nebylo možné přesně sekvenovat tento úsek a najít tak další polymorfismy, a proto byly navrženy další primery v těsné blízkosti této repetice (přímý ATA GCC ATC ATT AGC TGC CTC C a zpětný TTA AAG TGT CTC CTT CTG GTG GG), aby mohl být tento úsek amplifikován.

PCR byla prováděna na teplotním cykleru GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems). Složení reakční směsi na objem 25 µl bylo následující: 19,8 µl deionizované vody, 2,5 µl 10x LA PCR pufru complete (500mM Tris-HCl, pH 9,3 (25 °C), 150 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 22,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Tween 20, Top-Bio) 0,5 µl dNTP (Fermentas, Vilnius, Litva), 0,5 µl obou primerů (Invitrogen), 0,2 µl LA DNA polymerázy (5 U/µl, Top-Bio) a 2 µl lyzátu DNA.

Teplotní profil PCR: počáteční denaturace 95 °C / 2 min., 30 cyklů - denaturace 95 °C / 20 s, annealing 54 °C / 30 s, elongace 68 °C / 30 s, závěrečná elongace 68 °C / 7 min.

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

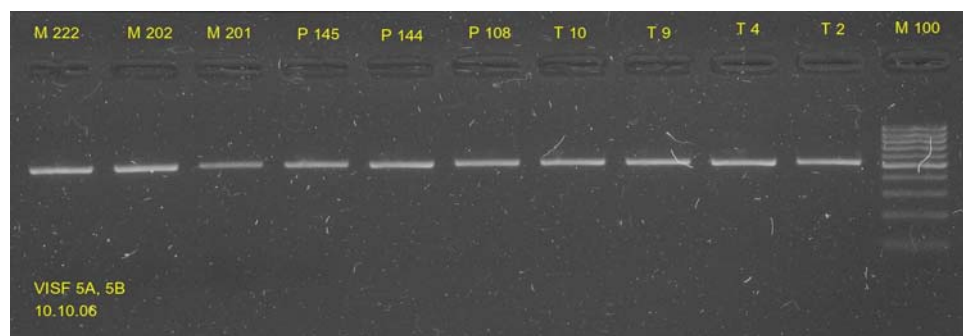
Štěpení PCR-produktů genu visfatin příslušnými restričními endonukleázami probíhalo při teplotě 37 °C po dobu 2 hod. (*Hpa* II) a při teplotě 55 °C po dobu 2 hod. (*Bse* DI). Složení restriční směsi: 5 µl PCR produktu, 8 µl deionizované vody, 1,5 µl pufru Y<sup>+</sup>/TANGO a 0,5 µl endonukleázy – *Hpa* II (Fermentas, Vilnius, Litva) a 5 µl PCR produktu, 7,5 µl deionizované vody, 1,5 µl pufru Y<sup>+</sup>/TANGO a 1 µl endonukleázy – *Bse* DI (Fermentas, Vilnius, Litva).

Separace jednotlivých fragmentů byla prováděna na 3% agarosovém gelu s přidavkem ethidium bromidu při 100–120 V po dobu 20–40 minut. Po vizualizaci pod UV-světlem byly odečteny jednotlivé genotypy.

## VÝSLEDKY A DISKUZE

Při detekci polymorfismu v genu visfatin jsme nejprve amplifikovali fragment o velikosti 524 bp, kde se hledané polymorfismy nacházely (Obrázek č. 1).

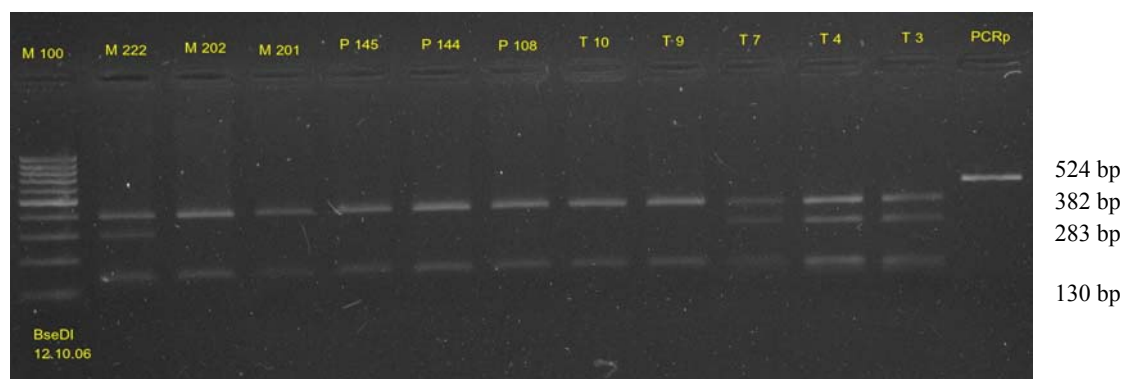
Obr. 1 PCR produkty o velikost 524 bp



M 100 – marker; T2, T 4 – české bílé ušlechtilé; T 9, T 10 – landrasse; P 108, P 144, P 145 – pietrain a M 201, M 202, M 222 – kříženci plemen pietrain a meishan

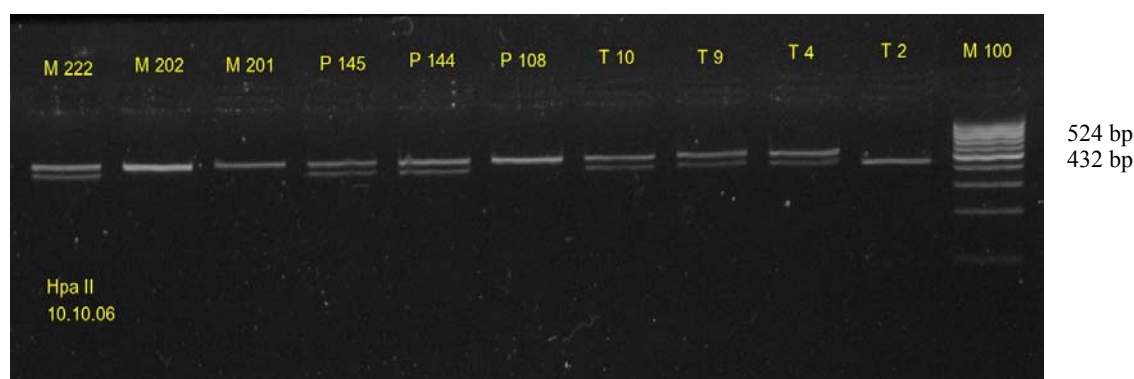
Získané PCR produkty jsme štěpili vybranými restričními endonukleázami (*BseDI* a *HpaII*). *BseDI* štěpilo sekvenci s nukleotidem G na fragmenty o velikosti: 99, 283, 12 a 130 pb a sekvenci s nukleotidem T na fragmenty o velikosti: 382, 12 a 130 pb (Obrázek č. 2). *HpaII* štěpilo sekvenci s nukleotidem C na fragmenty o velikosti 432 a 92 bp a vůbec neštěpilo sekvenci s nukleotidem T a velikost fragmentu byla 524 bp (Obrázek č. 3).

Obr. 2 RFLP s restričním enzymem *BseDI*



M 100 – marker; T3, T 4 – české bílé ušlechtilé; T7, T 9, T 10 – landrasse; P 108, P 144, P 145 – pietrain a M 201, M 202, M 222 – kříženci plemen pietrain a meishan; PCRp – PCR produkt o velikosti 524 bp

Obrázek č.2 RFLP s restričním enzymem *BseDI*



M 100 – marker; T2, T 4 – české bílé ušlechtilé; T 9, T 10 – landrasse; P 108, P 144, P 145 – pietrain a M 201, M 202, M 222 – kříženci plemen pietrain a meishan

Získané genotypy jsou uvedeny v Tab. 1. Vzorky P 108 a M 199 byli rodiče zvířete M 222, M 199 byl otec zvířat M 201 a M 202 a P144 byla matka P 128.

Tab. 1 Tabulka získaných genotypů

vzorek	T2	T3	T4	T7	T9	T10	P108	P128	P144	P145	M199	M201	M202	M205	M222	GENO
<i>BseDI</i>	-	G/T	G/T	G/T	T	T	T	T	T	T	G/T	T	T	G/T	G/T	
<i>HpaII</i>	C	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	T	C	C/T	C/T	C/T	T	T	C/T	C/T	

## ZÁVĚR

V této práci jsme porovnávali prasečí sekvenci s lidskou sekvencí a zvolili jsme nejkratší introny v lidské sekvenci (mezi exonem 5 a 6 a mezi 9 a 10) a podle jejich umístění jsme navrhli primery. Provedli jsme PCR s navrženými primery, sekvenovali PCR produkt na sekvenátoru ABI PRISM 3100 a našli polymorfismy. Pomocí vhodných restričních endonukleáz (Hpa II a Bse DI), nově navržených primerů se genotypovaly plemena české bílé ušlechtilé, landrasse, pietrain a kříženec plemen pietrain a meishan.

Zatím jsme získali předběžné výsledky a další analýzy budou pokračovat ve spolupráci s VÚŽFG Liběchov, kde se bude genotypovat soubor rodičovských a filiálních linií a bude se klonovat repetitivní část sekvence v intronu mezi exonem 9 a 10, která se nepodařila naamplifikovat metodou PCR.

## LITERATURA

Bailey SD, Loredó-Ostí JC, Lepage P, Faith J, Fontaine J, Desbiens KM, Hudson TJ, Bouchard C, Gaudet D, Perusse L, Vohl MC, Engert JC, Barák J. (2006): Common polymorphisms in the promoter of the visfatin gene (PBEF1) influence plasma insulin levels in a French-Canadian population. *Diabetes* 55(10):2896-902.

PBEF1 pre-B-cell colony enhancing factor 1 (*Homo sapiens*) [online]. 1.11.2006 [cit. 4.11.2006]. Dostupné z: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=full\\_report&list\\_uids=10135](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=10135)

El-Eter E., Al-Kayali A., Al-Jabri B., Al-Tuwaijiri A., Al-Omran M., (2006): Visfatin, a Novel Visceral Fat Peptide, Correlates with the Severity of Peripheral Arterial Disease in Diabetic Patients. In annual meeting The Canadian Society for Vascular Surgery 2006. Calgary, Alberta.

Tilg H. a Moschen AR. (2006): Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology* 2006 Oct;6(10):772-83.

Correspondences between human and pig chromosomal segments [online]. 22.5.2002 [cit. 4.11.2006]. Dostupné z: <http://www.toulouse.inra.fr/lgc/pig/compare/SSCHTML/SSC9S.HTM>