

ZB MED - Informationszentrum Lebenswissenschaften

11th Day of the Doctoral Student

Seyfert, Hans-Martin

Dummerstorf, 2010

Einflüsse von Polymorphismen in 5' regulierenden Abschnitten porciner
Komplementgene auf ihre Expression und Merkmale der Tiergesundheit -
Sabine Schütze, Eduard Murani, Siriluck Ponsuksili [sic] ...

urn:nbn:de:hbz:38m:1-30112

Tag des Doktoranden, 19. Mai 2010, FBN Dummerstorf

Einflüsse von Polymorphismen in 5' regulierenden Abschnitten porciner Komplementgene auf ihre Expression und Merkmale der Tiergesundheit

Sabine Schütze, Eduard Murani, Siriluck Ponsuksili und Klaus Wimmers

Leibniz-Institut für Nutztierbiologie, Forschungsbereich Molekularbiologie,
Wilhelm-Stahl-Allee 2, 18196 Dummerstorf

1 Einleitung

Das Komplementsystem gilt als erste Barriere des Organismus zur Abwehr von bakteriellen Erregern. Es ist ein Mechanismus der angeborenen Immunabwehr, der die direkte Zytolyse von Pathogenen und deren Opsonierung zur Phagozytose bewirkt. Außerdem hat es einen regulierenden Einfluss auf die Entzündungsreaktion und die humorale und zelluläre Immunantwort. Es gibt drei Wege der Komplementaktivierung: den klassischen, den alternativen und den Lektin-Weg. Alle drei Reaktionswege führen schließlich zur Bildung des Membran-attackierenden Komplexes (MAK). Der MAK besteht aus den Komponenten C5b, C6, C7 und C8 sowie einer variablen Anzahl von C9- Molekülen (Stanley et al. 1985).

Die Regulation der Genexpression muss besonders bei Genen des Immunsystems fein abgestimmt sein, da es sonst negative Auswirkungen haben kann. Eine zu geringe Immunantwort resultiert in der Manifestation einer Infektion, während eine überschießende Reaktion zu Schädigung des Wirtsorganismus führen kann. Der 5'-Bereich eines Gens hat dabei eine Schlüsselposition, da *cis*-regulierende Elemente wie Promotoren die Höhe, den Ort und die Chronologie der Genexpression determinieren können.

Die Gene für Komplementkomponenten stellen Kandidatengene für Krankheitsresistenz dar. Polymorphismen in den transkribierten Abschnitten porciner Komplementgene wurden identifiziert und Assoziationen mit Merkmalen der hämolytischen Komplementaktivität, der Akute-Phase-Reaktion und Antikörperantwort gezeigt (Kumar et al. 2004; Wimmers et al. 2003). Ferner wurden QTL-Regionen für diese Merkmale, unter anderem nach Stimulation mit *Mycoplasma hyopneumoniae* Vakzine, in einer experimentellen F₂-Population kartiert (Wimmers et al. 2009). Weitere Untersuchungen umfassen die Identifizierung regulativer Strukturen der Komplementgene und DNA-Varianten, die die temporo-spatiale Verteilung und Höhe der Transkription beeinflussen. Des Weiteren sollen in kommerziellen Populationen neue Merkmale als Parameter der allgemeinen Abwehrkraft und Tiergesundheit

evaluiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wird über die Untersuchung der 5' regulierenden Abschnitte des porcinen *C9*, die Erfassung von Lungenveränderungen bei Schlachtschweinen als Merkmal der Tiergesundheit, berichtet.

2 Material und Methoden

Tiermaterial: In die Untersuchungen werden Tiere der Rassen Deutsche Landrasse (DL), Deutsches Edelschwein (DE) sowie Pietrain (Pi) und deren Kreuzungen aus neun Herden einbezogen. Zur Untersuchung wurde DNA aus Lebergewebe von 310 Schlachtschweinen verwendet.

Promotorsequenz: Die Identifizierung der Promotorsequenz erfolgte mittels BLAST ausgehend von der humanen *C9* Sequenz mit porcinen BAC-Endsequenzen (Leeb et al. 2006). Ein BAC-Klon, der die gesamte Sequenz des *C9* Gens enthielt, wurde mit dem QIAGEN® Large-Construct-Kit nach Herstellerangaben isoliert und zur Sequenzierung mittels Primerwalking verwendet. Zur Detektion konservierter Sequenzabschnitte und Transkriptionsfaktorbindungsstellen wurden *in silico* Analysen der 5'-Region mit 'TESS' (Transcription Elements Search System; www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess) sowie 'ECR-Browser' und 'Mulan' (www.dcode.org) durchgeführt.

SNP-Analyse und Genotypisierung: Für die Identifizierung von Polymorphismen wurden die Sequenzen von 6 Schweinen verschiedener Rasse verwendet (Hampshire, Duroc, Deutsche Landrasse, Pietrain, Berliner Miniaturschwein, Muong Khuong). Die Genotypisierung eines gefundenen Polymorphismus erfolgte mittels PCR-RFLP.

Expressionsprofile: Die mRNA-Expression wurde mit Hilfe von qRT-PCR (LightCycler® 480) bestimmt. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Für die Normalisierung wurden die zwei Referenzgene ribosomales Protein L32 (*RPL32*) und Albumin (*ALB*) verwendet. Die relative Menge und die ΔC_P -Werte wurden als Faktoren für die Quantifizierung des mRNA-Gehaltes genutzt. Das geometrische Mittel der beiden Referenzgene diente zur Berechnung der relativen Menge.

Statistische Analyse: Für die Assoziationsstudien wurden Proben von Tieren mit und ohne pathologischem Lungenbefund, der visuell bei der amtlichen Fleischuntersuchung bestimmt wurde, eingesetzt. Um zu überprüfen, ob der SNP C(-737)T einen Einfluss auf die mRNA-Expression oder das Vorkommen von pathologischen Lungenbefunden hat, wurde die SAS®-Prozedur „MIXED“ (SAS Institute, Cary, NC) verwendet.

3 Ergebnisse und Diskussion

Die Sequenzierung des porcinen *C9*-Gens bestätigt die auch beim humanen *C9* gezeigte Homologie (Coto et al. 1991; Hobart et al. 1995) zwischen den Komponenten *C6*, *C7*, *C8A*, *C8B* und *C9*. Die hier analysierte Sequenz der Promotorregion umfasst 1077 bp. Durch vergleichende Sequenzierung wurden insgesamt 9 Polymorphismen detektiert. *In silico*-Analysen zeigten konservierte Sequenzabschnitte im *C9*-Promotor (Abbildung 1).

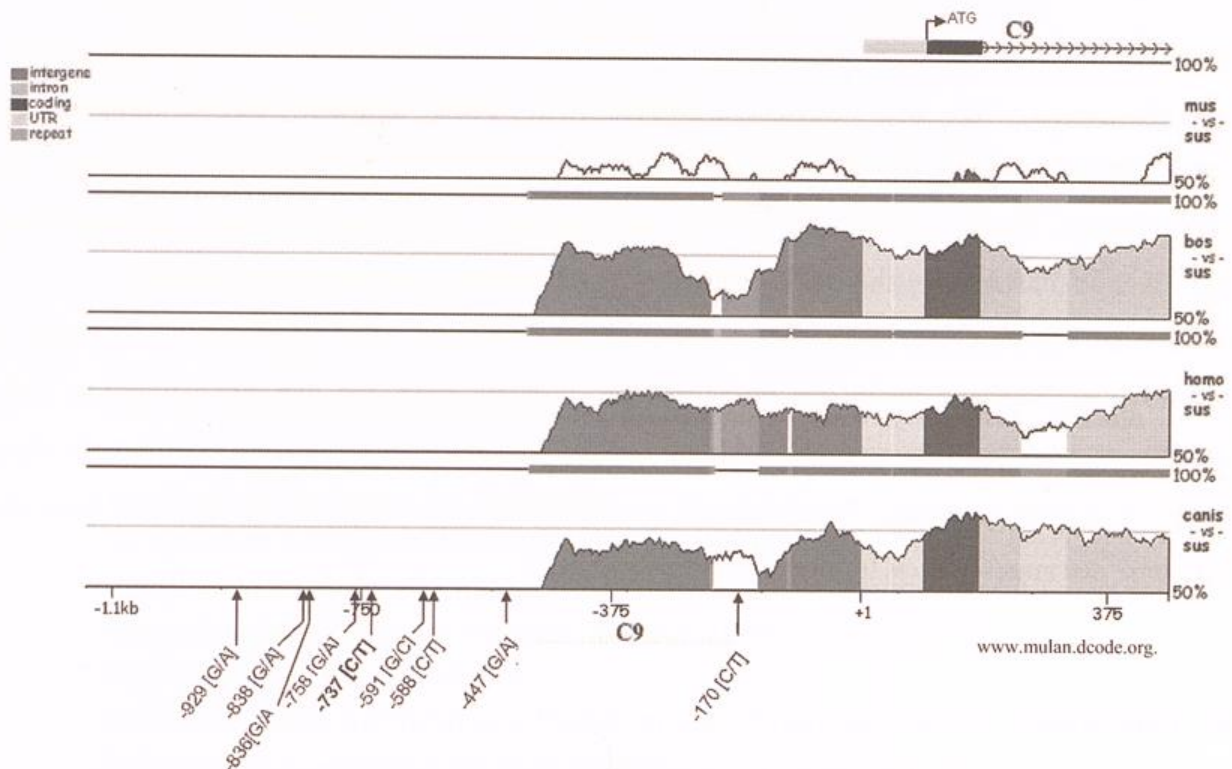


Abbildung 1 Speziesvergleichende Darstellung konservierter Regionen im Promotor des *C9*-Gens
Positionen der SNPs sind durch Pfeile angezeigt, die Nukleotidaustausche sind in eckigen Klammern angegeben

Darüber hinaus konnten potenzielle Transkriptionsfaktorbindestellen identifiziert werden. Diese sind möglicherweise von funktioneller Bedeutung für die Expression und damit für die Ausprägung von Merkmalen der Immunkompetenz, da sie durch die detektierten SNPs dahingehend beeinflusst werden, dass sich durch den Nukleotidaustausch die Erkennungsmotive ändern (Tabelle 2). Bisher wurde der Einzelbasenaustausch von Cytosin zu Thymin an Nukleotidposition -737 bei 310 Tieren der Rassen DL, DE, Pi und deren Kreuzungen genotypisiert. Wie man in Tabelle 1 sehen kann, ist bei allen Rassen das T-Allel das häufigere Allel.

Tabelle 1: Verteilung der Allelfrequenzen innerhalb der verwendeten Rassen

Allel		Rasse				
		DE	DL	DE x DL	DE x (DE x DL)	Pi x (DE x DL)
Frequenz	C	0.24	0.33	0.24	0.05	0.23
	T	0.76	0.67	0.76	0.95	0.77

Tabelle 2: Positionen der gefundenen SNPs und Auswirkungen auf Transkriptionsfaktorerkennungssequenzen

SNP	Position (bp)	Nukleotidaustausch	Transkriptionsfaktor
1	-929	G > A	LVc > FOXC1
2	-838	A > G	Ik-1 > NF-AT
3	-836	G > A	Pu box binding factor > c-Ets-2
4	-758	G > A	→ TCF-1A
5	-737	C > T	→ HOXA5
6	-652	C > G	Pbx1 > XPF-1
7	-588	C > T	→ HNF-6
8	-447	A > G	→ USF1
9	-170	C > T	-

Als Parameter für den Gesundheitsstatus der Tiere wurden Beobachtungen der Lungenveränderungen aus der amtlichen Fleischuntersuchung herangezogen. Von den hier 310 erfassten Tieren wiesen 109 (35 %) pathologische Lungenbefunde auf. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit dem Genotyp konnte jedoch nicht gezeigt werden.

Die statistische Analyse ergab eine Assoziation des SNP C(-737)T mit der Genexpression des C9. Das Vorhandensein des homozygoten T-Allels führt bei den Schweinen zu einer signifikant erhöhten Expression ($p < 0.0001$). Eine erhöhte Menge des C9 resultiert in einer größeren Anzahl an MAK. Eine Vielzahl von membran-attackierenden Komplexen kann die Effizienz der angeborenen Immunantwort verstärken.

4 Literatur

- Coto E, Martineznaves E, Dominguez O, DiScipio RG, Urra JM, LopezLarrea C (1991) DNA Polymorphisms and Linkage Relationship of the Human-Complement Component C6, C7, and C9 Genes. *Immunogenetics* 33:184-187.
- Hobart MJ, Fernie BA, Discipio RG (1995) Structure of the Human C7 Gene and Comparison with the C6, C8A, C8B, and C9 Genes. *Journal of Immunology* 154:5188-5194.
- Kumar KG, Ponsuksili S, Schellander K, Wimmers K (2004) Molecular cloning and sequencing of porcine C5 gene and its association with immunological traits. *Immunogenetics* 55:811-817.
- Leeb T, Dolle K, Haase B (2006) Sequence analysis of the porcine IFNAR1 and IFNGR2 genes. *Cytogenetic and Genome Research* 115:134-137.
- Stanley KK, Kocher HP, Luzio JP, Jackson P, Tschopp J (1985) The sequence and topology of human complement component C9. *EMBO J* 4:375-382.
- Wimmers K, Mekchay S, Schellander K, Ponsuksili S (2003) Molecular characterization of the pig C3 gene and its association with complement activity. *Immunogenetics* 54:714-724.
- Wimmers K, Murani E, Schellander K, Ponsuksili S (2009) QTL for traits related to humoral immune response estimated from data of a porcine F2 resource population. *International Journal of Immunogenetics* 36:141-151.

In der Schriftenreihe sind bisher erschienen:

- Heft 1** Herrendörfer, G.; Miesecke, K. J. (Editors)
Selection Procedures I
3rd Schwerin Conference of Mathematical Statistics – Selection Procedures,
Bad Doberan, 5-10th September 1993
- Heft 2** Herrendörfer, G.; Miesecke, K. J. (Editors)
Selection Procedures II
3rd Schwerin Conference of Mathematical Statistics – Selection Procedures,
Bad Doberan, 5-10th September 1993
- Heft 3** Souffrant, W.-B.; Hagemeister, H. (Editors)
VIth International Symposium on Digestive Physiology in Pigs,
Bad Doberan, 4-6th October 1994, Proceedings – Volume I
- Heft 4** Souffrant, W.-B.; Hagemeister H. (Editors)
VIth International Symposium on Digestive Physiology in Pigs,
Bad Doberan, 4-6th October 1994, Proceedings – Volume II
- Heft 5** Sumpf, D.; Tuchscherer, A.; Schmidt, K.
Grundlagen der Versuchsplanung und ihre Durchführung mit CADEMO,
Dummerstorf 1995
- Heft 6** Ender, K. (Editor)
2nd Dummerstorf Muscle – Workshop Muscle Growth and Meat Quality,
Rostock, 17-19th May 1995, Proceedings
- Heft 7** Matthes, H.-D.; Demo, M. (Editoren)
Symposium anlässlich des 65. Geburtstag von Dr. agr. habil. W. Jentsch
Regulation des Stoffwechsels unter Beachtung der Ernährung und
Umgebungstemperatur, Vietgest, 27. Mai 1994
- Heft 8** Panicke, L.; Fischer, E. (Editoren)
Kolloquium Milchprotein und Proteinansatz, Graal-Müritz, 11. und 12. April 1996
- Heft 9** Manteuffel, G.; Steinhardt, M. (Editoren)
Workshop Ethophysiologie landwirtschaftlicher Nutztiere, Dummerstorf, 22. Mai 1997
- Heft 10** Voigt, J.; Hagemeister, H. (Editoren)
Internationale Vortragstagung Verdauungsphysiologie und Stoffumsatz beim
Wiederkäuer, Rostock, 21. Februar 1997
- Heft 11** Junghans, P.; Beyer, M.; Hackl, W. (Editors)
International Symposium
Energetic Feed Evaluation an Regulation of the Nutrient and Energy Metabolism in Farm
Animals, Rostock, 29-30th May 1998, Proceedings
- Heft 12** Schwerin, M.; Seyfert, H.-M.; Schmidt P. (Editors)
International Symposium Candidate Genes for Animal Health Rostock-Warnemünde,
25-27th August 1999
- Heft 13** Panicke, L.; Fischer E. (Editoren)
Arbeitstagung DNA Polymorphismen beim Milchrind, Graal-Müritz, 23. und 24. März 2000
- Heft 14** Reinsch, N.; Nürnberg, G. (Editors)
9th Quantitative Trait Locus Mapping and Marker-Assisted Selection Workshop,
Rostock, 14-15th May 2004
- Heft 15** Panicke, L.; Staufenberg, R. (Editoren)
Kolloquium Molekulargenetische und physiologische Merkmale in der Rinderzucht,
23.03.2005 Dummerstorf