

Thesis Title Identification of Gene Associated with Porcine Hernia Scrotalis

Author Mr. Watchara Laenoi

Degree Master of Science (Agriculture) Animal Science

Thesis Advisory Committee

Lect. Dr. Kesinee

Gatphayak

Chairperson

Assoc. Prof. Dr. Therdchai

Vearasilp

Member

Abstract

Scrotal hernia is a very common congenital disorder in pigs which is caused by a prolapse of part of the intestine through the inguinal canal into the scrotum. The development of the defect results from either an abnormal wide inguinal canal or an incomplete obliterated processus vaginalis after testicular descent. One hypothesis has been that the testis descends through the propulsive activity of the smooth and striated muscles of the gubernaculum. The smooth muscle component has been suggested to undergo programmed cell death after the descent, whereas a persistence of the smooth muscle has been regarded to hinder obliteration finally leading to a hernia. Therefore, 2 genes involved in the apoptosis cascade were chosen as functional candidate genes for hernia. *Preprotachykinin A (TAC1)* encodes two products of the tachykinins peptide family. They play an important role as neurotransmitters and interact with nerve receptors and smooth muscle cells. The *BCL2-associated X protein (BAX)* gene encodes the BAX protein that functions as an accelerator of programmed cell death. To isolate the genes from the porcine P1-derived artificial chromosome (PAC) library TAIGP714, probes were generated by primers derived from the human orthologs.

The *TAC1*-specific primers formed a 415-bp long amplicon (spanning from exon 7 to the 3'UTR) in pigs (GenBank Accession no: AM233488). A *BAX*-specific fragment (501 bp) was amplified encompassing exons 3 and 4 (GenBank Accession no: AM233489). Probes were sequenced and the comparison with the human genes verified sequence identities of 84% and 94% for *TAC1* and *BAX*, respectively. The chromosomal assignments of the genes were done by analyses of porcine hybrid panels (somatic cell and radiation) and confirmed by fluorescent *in situ* hybridization (FISH). *TAC1* was assigned to *SSC9q12-q14* and *BAX* to *SSC6q21*. *BAX* has been assigned to a region on *SSC6* associated with the defect. Thus, this gene has been chosen for further characterization, whereas *TAC1* was excluded as candidate gene due to its chromosomal localization.

The *BAX*-containing PAC-clone was isolated and sequenced. The partial porcine *BAX* gene sequence of 10741 bp consists of the 5'-UTR and exons 1 to 4. The sequence shares 90% homology with the human gene. Comparative sequencing analysis of herniated pigs and of phenotypically unaffected individuals belonging to different breeds revealed no polymorphisms in the exonic regions. Two single-nucleotide polymorphisms (SNPs) were detected in intron 1 (C8188T) and 3 (T8737A). Totally, 138 porcine DNAs (37 herniated and 101 normal pigs) were genotyped by PCR-RFLPs (*EaeI* for C8188T and *BspHI* for T8737A). Allele frequency estimates for C8188T are $p(C)=0.804$ and $q(T)=0.196$, and for T8737A are $p(T)=0.975$ and $q(A)=0.025$. SNPC8188T showed significant differences between normal and hernia pigs in the German population ($P \leq 0.05$). Thus, this SNP can be taken for further association analyses in large populations to elucidate the common genetic basis for scrotal hernia.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การจำแนกยีนที่สัมพันธ์กับโรคไส้เลื่อนที่อัมตะของสุกร		
ผู้เขียน	นายวัชร แลน้อย		
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สัตวศาสตร์		
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	อ.ดร.เกษินี เกตุพยัคฆ์ รศ.ดร. เทอดชัย เวียรศิลป์	ประธานกรรมการ กรรมการ	

บทคัดย่อ

โรคไส้เลื่อนที่อัมตะเป็นโรคทางพันธุกรรมที่พบทั่วไปในสุกร เกิดจากการเคลื่อนที่ของลำไส้ผ่านช่องว่างบริเวณขาหนีบลงสู่ถุงหุ้มอัมตะ การเกิดโรคเป็นผลจากความกว้างของช่องว่างบริเวณขาหนีบผิดปกติ หรือการกำจัดกล้ามเนื้อที่มีหน้าที่ในการดึงอัมตะลงสู่ถุงหุ้มอัมตะภายหลังการเคลื่อนที่ของอัมตะไม่สมบูรณ์ ข้อสมมุติฐานคือการเคลื่อนที่ของอัมตะเกิดจากการทำงานของกล้ามเนื้อเรียบและกล้ามเนื้อลายที่เป็นองค์ประกอบของ Gubernaculum ส่วนประกอบกล้ามเนื้อเรียบจะถูกกำจัดผ่านกระบวนการตายของเซลล์ หลังจากอัมตะถูกคีกลงสู่ถุงหุ้มอัมตะแล้ว การคงอยู่ของกล้ามเนื้อส่งผลต่อเนื้อให้เกิดโรคไส้เลื่อนที่อัมตะ ดังนั้นได้เลือกยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการตายของเซลล์ 2 ยีน คือ *Preprotachykinin A (TAC1)* ซึ่งถอดรหัสเป็นโปรตีน Tachykinins 2 ชนิดที่มีบทบาทเป็นสารสื่อประสาท มีปฏิสัมพันธ์กับตัวรับของเส้นประสาทและเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ ยีน *BCL2-associated X protein (BAX)* ถอดรหัสเป็นโปรตีน BAX มีบทบาทเป็นตัวเร่งให้เกิดกระบวนการตายของเซลล์ ได้จำแนกยีน *TAC1* และ *BAX* ใน Porcine P1-derived artificial chromosome (PAC) library TAIGP714 โดยใช้ตัวติดตามที่สร้างขึ้นจากคู่ Primers ที่ออกแบบจากยีนของมนุษย์ สามารถสังเคราะห์ตัวติดตามสำหรับยีน *TAC1* ของสุกรยาว 415 คู่เบส (ครอบคลุม exon 7 และ 3'UTR) (GenBank Accession no: AM233488) และยีน *BAX* ยาว 501 คู่เบสประกอบด้วย exons 3 ถึง 4 (GenBank Accession no: AM233489) ทำการหาลำดับเบสของตัวติดตามและเปรียบเทียบลำดับเบสกับยีนของมนุษย์

พบความเหมือน 84% และ 94% (*TAC1* และ *BAX* ตามลำดับ) การศึกษาตำแหน่งของยีนทำโดยวิธี Radiation hybrid panel, Somatic cell panel และ Fluorescent *in situ* hybridization พบว่ายีน *TAC1* อยู่บนโครโมโซมที่ 9q12-21 และ *BAX* อยู่บนโครโมโซมที่ 6q21 *BAX* ซึ่งอยู่ในส่วนของโครโมโซมที่ 6 มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคได้เลือกศึกษาต่อไป ส่วนยีน *TAC1* ได้ตัดออกจากการเป็นยีนคัดเลือกรหัสของโรคไส้เลื่อน เนื่องจากอยู่บนโครโมโซมที่ไม่สัมพันธ์กับการเกิดโรค

ทำการจำแนก PAC clone ที่มียีน *BAX* และหาลำดับเบส โดยจำแนกได้ 10741 คู่เบสซึ่งมีส่วนของยีน *BAX* ประกอบด้วย 5'-UTR และ Exon 1 ถึง Exon 4 โดยมีความเหมือนกับยีนของมนุษย์ 90% การวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างลำดับเบสของสุกรที่แสดงลักษณะของโรคไส้เลื่อนที่อัมตะและสุกรปกติสายพันธุ์ต่าง ๆ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในส่วน Exon แต่ตรวจพบการแทนที่ของเบส (SNPs) ใน Intron 1 (C8188T) และ Intron 3 (T8737A) ทำการจีโนไทป์สุกรทั้งหมด 138 ตัว แบ่งเป็นสุกรที่เป็นโรคไส้เลื่อนที่อัมตะ 37 ตัว และสุกรต่างสายพันธุ์ที่มีลักษณะปกติ 101 ตัว โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP (*EcoRI* สำหรับ C8188T และ *BspHI* สำหรับ T8737A) จากการคำนวณความถี่อัลลีลของทั้งสอง SNPs พบว่า C8188T มีค่า $p(C)=0.804$, $q(T)=0.196$ และ T8737A มีค่า $p(T)=0.975$, $q(A)=0.025$ ซึ่งการแทนที่ของ C8188T แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างสุกรปกติและสุกรที่เป็นโรคไส้เลื่อนในประชากรสุกรเยอรมัน ($P \leq 0.05$) ดังนั้นสามารถนำจุดกลายพันธุ์นี้ไปใช้ศึกษาความสัมพันธ์กับโรคไส้เลื่อนที่อัมตะของสุกรในประชากรขนาดใหญ่เพื่อใช้เป็นยีนพื้นฐานสำหรับโรคไส้เลื่อนที่อัมตะ