Povezanost polimorfizma gena FASN s masnokiselinskim sastavom mlijeka

Čuić, Antonela

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:883247

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Veterinary Medicine - Repository of PHD, master's thesis

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

Antonela Čuić

Povezanost polimorfizma gena FASN s masnokiselinskim sastavom mlijeka

ZAGREB, 2016.

ZAVOD ZA STOČARSTVO
ZAVOD ZA PREHRANU I DIJETETIKU ŽIVOTINJA

PREDSTOJNIK: prof. dr. sc. Anamaria Ekert Kabalin
PREDSTOJNIK: doc. dr. sc. Hrvoje Valpotić

MENTORI: Izv. prof. dr. sc. Tomislav Mašek
dr. sc. Kristina Starčević

ČLANOVI POVJERENSTVA ZA OBRANU DIPLOMSKOG RADA:

1. dr. sc. Maja Maurić
2. dr. sc. Kristina Starčević
3. izv. prof. dr. sc. Tomislav Mašek
4. dr. sc. Diana Brozić (zamjena)

Zahvala:

U prvom redu, hvala dragom Bogu na svim njegovim darovima, na volji, strpljenju, znanju koje me pratilo svih šest godina studija.

Veliko hvala mojim fantastičnim mentorima, učiteljima i prijateljima, Tomislavu Mašeku i Kristini Starčević koji su uvijek bili spremni pomoći.

Hvala asistentici dr.sc. Maji Maurić na pomoći pri izradi diplomskog rad.

Hvala mojim roditeljima, majci i ocu, koji su me odgajali i vjerovali u mene uvijek i u svemu što sam radila.

Hvala mom dragom Radi Bebek, koji je bio zadužen za sve tehničke probleme i koji je bio najbolji od najboljih prijatelja.

Hvala svoj ostaloj rodbini, kumovima i prijateljima koji su utjecali na mene na pozitivan način.

I na kraju, hvala svim mojim profesorima, docentima, asistentima koji su mi neumorno prenosili znanje i koji su aktivno sudjelovali u mom fakultetskom obrazovanju.

SADRŽAJ

1. Uvod 1

2. Materijal i metode 4

2.1 Životinje 4
2.2 Određivanje sastava masnih kiselina 4
2.3 Izolacija genomske DNK iz uzoraka mlijeka 5
2.4 Metoda lančane reakcije polimerazom i restrikcija s odgovarajućim restrikcijskim endonukleazama (PCR – RFLP metoda) 6
2.5 Statistička obrada podataka 8

3. Rezultati 9

3.1 Sastav masnih kiselina 9
3.2 Genotipizacija 11

4. Rasprava 13

5. Zaključci 15

6. Literatura 16

7. Sažetak 19

8. Summary 20

9. Životopis 21

1. Uvod

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi povezanost polimorfizma gena FASN s masnokiselinskim sastavom mlijeka. Hipokrat je 400 godina prije Krista tvrdio da je mlijeko najsavršenija prirodna hrana što je kasnijim istraživanjima i potvrđeno. Mlijeko je temeljna namirnica u prehrani koja sadžava gotovo sve sastojke neophodne za normalno fiziološko funkcioniranje organizma ljudi ali i drugih sisavaca. Osim velike biološke vrijednosti proteina, povoljnog omjera mineralnih tvari, vitamina i šećera, mlijeko je važno zbog mliječne masti, njene količine i omjera različitih masnih kiselina. Tijekom 1950tih mlijeko je prvi puta povezano s promjenama u sastavu lipida plazme te ubrzo nakon toga i sa štetnim posljedicama na ljudsko zdravlje (SEGALL, 1977.). Istraživanja iz smjera nutricionizma, genetike, tehnologije uzgoja i veterine se temelje na spoznaji da što zdravijim kravama koje se kvalitetno hrane i koje imaju dobar genetski materijal potrošačima dajemo vrhunsko i kvalitetno sirovo mlijeko a samim tim i sigurnije i kvalitetnije mliječne proizvode.

Fiziološku proizvodnju i sastav mlijeka kontrolira više različitih gena. Oni utječu na količinu suhe tvari u mlijeku (proteini, šećer i mast) te posljedično tome na okus i nutritivna svojstva (HAUG i sur., 2007.; MASUKO, 1999.). Stoga utvrđivanje utjecaja pojedinih gena i njihovih polimorfizama na mliječnost i sastav mliječne masti, predstavlja potencijal za provedbu genetske selekcije mliječnih krava u smislu proizvodnje mlijeka bogatog poželjnim masnim kiselinama. Nezasićene masne kiseline su korisne za ljudsko zdravlje (KOLETZKO i sur., 1998.). Na primjer, oleinska kiselina, nezasićena masna kiselina, može doprinijeti prevenciji ateroskleroze (MASSARO i sur., 1999.). Prosječan omjer masnih kiselina u mliječnoj masti kod većine krava obuhvaćenih ispitivanjima je 70% zasićenih, 25% mononezasićenih i 5% polinezasićenih masnih kiselina (GRUMMER, 1991.; JENSEN, 2002.; KALAC i SAMKOVA, 2010.). Veliki broj istraživanja provedenih na različitim pasminama mliječnih krava potvrđuje tri važna gena odgovorna za sadržaj mliječne masti: *acylCoA:diacylglicerol acyltransferase 1* (DGAT1); *growth hormone receptor* (GHR) i *stearoyl-CoA desaturase 1* (SCD1) (SIGNORELLI i sur., 2009.). Osim njih u novije vrijeme je sve zanimljiviji gen FASN. Gen FASN kodira enzim sintazu masnih kiselina koji je multifuncionalni protein odgovoran za *de novo* sintezu dugolančanih zasićenih masnih kiselina čiji glavni produkt je palmitinska kiselina. Prijašnja istraživanja pokazala su postojanje povezanosti polimorfizama gena FASN s bitnim ekonomskim svojstvima (količina mlijeka i količina mliječne masti) kao i utjecaj na sastav pojedinih masnih kiselina u mlijeku

(MATSUMOTO i sur., 2012.). SNP-evi na različitim egzonima gena FASN i na različitim funkcionalnim domenama FASN proteina povezani su sa postotkom mliječne masti (ROY i sur. 2006.) i zastupljenosti srednjih i velikih lanaca masnih kiselina u mlijeku (MORRIS i sur., 2007.). Na egzonu 34 pronađena su dva *non-synonymous* SNP-a, na položajima 5848pb i 5863pb. SNP na poziciji 5848pb uzrokuje izmjenu A u G, što dovodi do zamjene aminokiseline treonina (T) u alanin (A; T1950A) (ROY i sur., 2006.), dok SNP na poziciji 5863pb uzrokuje izmjenu T u C, što dovodi do zamjene triptofana (W) u arginin (R; W1955R) (MATSUMOTO i sur., 2012.).

Kao posljedica istraživanja zdravstvenog utjecaja masnih kiselina javlja se jaki znanstveni trend smanjivanja količine zasićenih masnih kiselina i povećavanje količine višestruko nezasićenih masnih kiselina u mlijeku preživača raznim manipulacijama u hranidbi mliječnih preživača (MAŠEK i sur., 2014.). Naglasak se stavlja na kvalitetu masti a zatim na količinu. Pitanje kvalitete masti usredotočeno je na potencijalno štetne učinke zasićenih i trans-nezasićenih masnih kiselina na cirkulirajuću koncentraciju kolesterola (WILLIAMS, 2000.). Istodobno s ovim istraživanjima javljaju se novi podaci o pozitivnim učincima pojedinih masnih kiselina na zdravlje ljudi, posebice dugolančanih n3 masnih kiselina: eikozapentaenske (EPA) i dokozaheksaenske (DHA). Nakon njih i konjugirana linolna masna kiselina (CLA) postaje predmetom istraživanja sa svojim brojnim novotkrivenim svojstvima. Nacionalne i međunarodne prehrambene smjernice preporučuju da zasićene masne kiseline čine do 10% energetske vrijednosti obroka (COMMITTEE ON MEDICAL ASPECTS OF FOOD POLICY, 1994.). Danas se zna da su uglavnom laurinska, miristinska i palmitinska masna kiselina odgovorne za povećanje koncentracije LDL kolesterola, dok druge veće zasićene masne kiseline, kao stearinska, ne povećavaju ukupni kolesterol i LDL-kolesterol (BONANOME, 1988.). Učinak pojedinih masnih kiselina ipak ostaje nepoznat što se odražava na ograničenje korištenja različitih vrsta masti i ulja koje se koriste u prehrani. Kao zamjena za zasićene masne kiseline (SFA) koriste se polinezasićene (PUFA) ili mononezasićene masne kiseline (MUFA). U svijetu se danas puno govori o n3 i n6 masnim kiselinama. Prepoznata je njihova važnost u prevenciji različitih bolesti, a kako ih ljudi ne mogu sintetizirati, moraju ih uzimati hranom. Osim toga n3 i n6 masne kiseline moraju biti u povoljnom omjeru jer njihova neravnoteža može rezultirati većim rizikom za kronične bolesti srca, tromboze i druga upalna stanja. Druge kronične bolesti povezane s nedostatkom n3 PUFA uključuju hipertenziju, upalne i imunološke poremećaje, depresiju i neurološku disfunkciju. DHA ima važnost u razvoju neurona fetusa i novorođenčadi.

Obzirom na pozitivan utjecaj pojedinih masnih kiselina na zdravlje čovjeka te nastojanja da se poveća njihova količina u mlijeku, cilj ovog istraživanja bio je utvrditi postoji li povezanost polimorfizama gena FASN i masnokiselinskog sastava mlijeka kod Holštajn-frizijske pasmine goveda.

2. Materijal i metode

2.1 Životinje

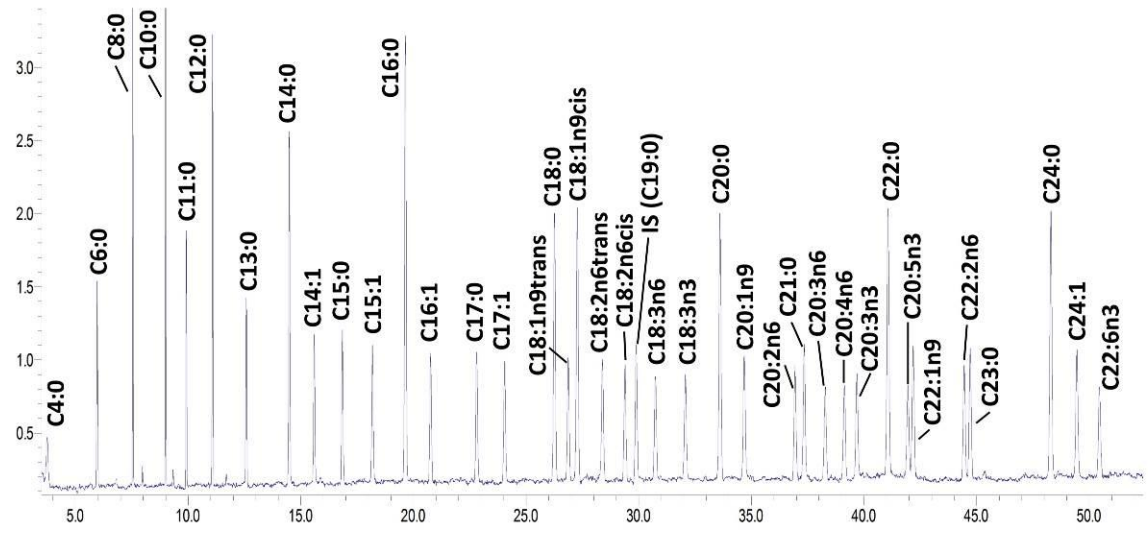
Istraživanje je provedeno na farmi mliječnih krava Holštajn-frizijske (HF) pasmine nedaleko od Zagreba. Istraživanjem je obuhvaćeno 25 mliječnih krava od druge do treće laktacije. Životinje su držane u lauf štali, slobodno, na punom podu i dubokoj stelji. Sve krave su hranjene istim obrokom koji je uključivao sjenažu lucerne i koncentratni dodatak na bazi kukuruza.

Uzorci su uzimani u sterilne epruvete tijekom jutarnje mužnje u izmuzištu. Svi uzorci su odmah smrznuti i pohranjeni na -20 ºC do daljnje obrade u laboratoriju.

2.2 Određivanje sastava masnih kiselina

Mliječna mast ekstrahirana je u smjesi izopropanola i heksana u omjeru 3:2 (MAŠEK i sur., 2014.). Nakon ekstrakcije masne kiseline reakcijom transesterifikacije prevedene su u njihove metilne estere pomoću 2M KOH u metanolu. Uzorci cu kratko centrifugirani.

Dobiveni esteri masnih kiselina analizirani su na plinskom kromatografu Shimadzu GC-MS Ultra Gas Chromatograph Mass Spectrometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) sa kapilarnom kolonom BPX70 (0.25 mm × 0.25 × 30 m, SGE, Austin, TX, USA). Kao plin nosioc korišten je helij. Uvjeti analize navedeni su na slici 1. Pojedine masne kiseline identificirane su primjenom eksternog standarda (37 component FAME mix, Supelco) te pomoću specifičnih fragmenata elektronske ionizacije (slika 1.). Kao interni standard korištena je C19:0.



Slika 1. Reprezentativni kromatogram eksternog standarda korištenog za identifikaciju masnih kiselina (37 component FAME mix, Supelco). Kolona: BPX70 (0.25 mm promjer, 0.25 μm film, 30 m dužina, SGE, Austin, TX, USA), injektor: 250°C, split: 80, linearna brzina 35 cm/s, početna temperatura 40°C, povećanje 1.5 °C/min do 200 °C, povećanje za 45 °C/min do 250 °C i zadržana 10 min. m/z 40 do 600, interface 220°C, izvor iona 250°C.

2.3 **Izolacija genomske DNK iz uzoraka mlijeka**

DNK je iz uzoraka mlijeka izolirana pomoću komercijalnog kita PathoProof™ DNA Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Finska) (MAURIĆ, 2015.). Prilikom izolacije DNK uzeta je količina od 350 μL homogeniziranog sirovog mlijeka. Svaki uzorak mlijeka je homogeniziran zajedno sa 350 μL *Lysis* otopine i *proteinase K mix.* Uključena je i negativna kontrola koja sadržava samo reagens bez mlijeka. Uzorci su inkubirani na 55°C tijekom 5min. Zatim su centrifugirani 5min na 5000 xg. Nakon centrifugiranja odvojen je pipetiranjem supernatant s masti. Talog je resuspendiran sa 100 μL *Lysis* otopine. Nakon inkubacije (37 °C, 10 min) dodan je svježi mix (*Proteinasa* K i pufer AL) te je sve ponovno inkubirano (55 °C, 10 min) i centrifugirano nekoliko sec. Nakon toga smo dodali 200 μL 96% etanola, homogenizirali te centrifugirali. Supernatant je prebačen u epruvete od 2ml koje sadrže *QIAamp mini spin column* nakon čega je centrifugiran 1min na 20 000 xg. *QIAamp mini spin column* je prebačen u nove epruvete od 2ml u koje je dodano 500 μL pufera AW1. Nakon centrifugiranja (1 min na 20 000 xg) *QIAamp mini spin column* je prebačen u nove epruvetice

te je dodano 500 µL pufera AW2. Nakon centrifugiranja (3 min na 20 000 xg) *QIAamp mini spin column* je prebačen u mikrocentrifugalne epruvetice te je dodano 50 µL pufera AE kako ne bismo previše razrijedili DNA. Nakon inkubacije i centrifugiranja provjerena je koncentracija i čistoća dobivene DNA.

Koncentracija i čistoća dobivene DNK očitana je na spektrofotometru BioDrop µLITE (BioDrop, Cambridge, UK). Čistoća izdvojene DNK određena je pomoću omjera apsorbancija valnih duljina 260/280 nm, a očitane vrijednosti bile su u preporučenom rasponu 1,8-2,0. Izolirana DNK je nakon toga pohranjena u zamrzivaču na -80 °C.

2.4 Metoda lančane reakcije polimerazom i restrikcija s odgovarajućim restrikcijskim endonukleazama (PCR – RFLP metoda)

Za umnažanje specifičnih odsječaka za gen FASN korišten je konvencionalni PCR. Slijed nukleotidnih baza početnica za svaki promatrani gen prikazan je u tablici 1.

Tablica 1. Sekvence početnih oligonukleotida odabranih odsječaka gena

Naziv gena	SNP (Mutacija)	Početnice* (eng. *Primers)*	Literatura
FASN	5848bpA/G (T1950A) 5863bpT/C (W1955R)	F: (5' – CTA CCA AGC CAG GCA GGT C - 3') R: (5' – GCC ATT GTA CTT GGG CTT GT - 3')	MATSUMOTO i sur. (2012.)

*F – uzvodna početnica (eng. *forward*), R - nizvodna početnica (eng. *reverse*)

Reakcijska smjesa za PCR umnažanje pripravljena je pomoću EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix (Takara Bio Inc., Japan) u kojem se nalazi Hot Start Taq polimeraza (HS PCR enzim), optimizirani pufer, smjesa dinukleotida (dNTP), boja za nanošenje uzoraka na gel za elektroforezu (Emerald green, zelena boja). Reakcijska smjesa sadržavala je Emeraldgreen master mix (1x) i odgovarajuće početnice (200nM). Reakcija umnažanja željenih odsječaka provedena je PCR-om (Mastercycler^{R} Personal 5332, Eppendorf AG, Hamburg, Njemačka). U svakom setu PCR reakcija rađena je po jedna negativna kontrola. Uvjeti provođenja PCR reakcije za umnažanje odsječka gena FASN: 94°C/5 min → 35 ciklusa (94°C/30 sek, 62°C/30 sek, 72°C/1 min) → 72°C/10 min.

Uspješnost PCR reakcije potvrđena je prisutnošću produkata na 1% agaroznom gelu u TAE puferu (20 min/90 V) u koji se dodaje 0,1 mg/mL etidij bromida (BIO-RAD, PowerPacTM HC-Cleaver Scientific Ltd MS mini, UK). Veličina PCR produkta određivana je DNK standardom od 25 pb (Lonza 25 pb ladder) te slikana pod UV-svjetlom transiluminatora (Mini BIS Pro*, DNR Bio-Imaging Systems, Jeruzalem, Izrael).

Metoda cijepanja umnoženih specifičnih odsječaka DNK (RFLP, engl. *restriction fragment length polymorphism*) koristi restrikcijske endonukleaze u reakciji cijepanja odsječka DNK s ciljem otkrivanja polimorfizama u jednom nukleotidu (SNP, engl. *single nucleotide polymorphism*). Odabrane endonukleaze i njihova restrikcijska mjesta dana su u tablici 2.

Tablica 2. Odabrane endonukleaze i njihova restrikcijska mjesta za pojedine odsječke gena

Gen	SNP (Mutacija)	Restrikcijska endonukleaza	PCR odsječak (pb)	Genotip	Restrikcijski odsječci (pb)
FASN	5848bpA/G (T1950A)	*Nci* I (*Bcn* I) (Takara Bio Inc., Japan) T/C	336	AA	336
				AG	336, 262, 74
				GG	262, 74
	5863bpT/C (W1955R)	*Hha* I (New England Biolabs Inc, UK)		TT	336
				TC	336, 247, 89
				CC	247, 89

Reakcija cijepanja umnoženih odsječaka DNK provedena je u restrikcijskoj smjesi volumena 10 µL koja se sastojala od: PCR produkta, odgovarajuće endonukleaze i pripadajućeg pufera. Restrikcijska smjesa je zatim inkubirana na temperaturi od 37 ºC u termobloku (Dry Bath Incubator, STARLAB International GmbH, Njemačka) tijekom 3 do 10 sati. Restrikcijski odsječci razdvojeni su elektroforezom (2-3 sata/140V) na 3% agaroznom gelu s etidijevim bromidom, a veličina im je određena primjenom DNK standarda od 25 ili 100 pb.

2.5 **Statistička obrada podataka**

Podaci su analizirani primjenom statističkog programa Statistica 12 (Statistica, Tulsa, OK, USA). Prije utvrđivanja statističkih značajnosti razlika, svi podaci su testirani na normalnost distribucije primjenom Shapiro-Wilks testa. Svi rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i standardna pogreška. Značajnost razlika srednjih vrijednosti testirana je t-testom. Razlike su smatrane statistički značajnim ako je $P < 0.05$.

Izračuni učestalosti alela i genotipova su izvedeni u skladu sa sljedećim jednadžbama:

$p = a + h/2$

$q = b + h/2$

gdje:

p = relativna učestalost alela A

q = relativna učestalost alela B

a = relativna učestalost homozigotnog genotipa AA

b = relativna učestalost homozigotnog genotipa BB

h = relativna učestalost heterozigotnog genotipa AB

Ravnoteža promatranih učestalosti genotipova je provjerena u skladu s Hardy-Weinbergovim zakonom, gdje je:

$1 = p^2 + 2pq + q^2$

Korišten je χ^2 test: $\chi^2(\alpha; d.f.) = \sum(P-O)^2/O$

gdje:

P = opažena učestalost genotipova

O = očekivana učestalost genotipova

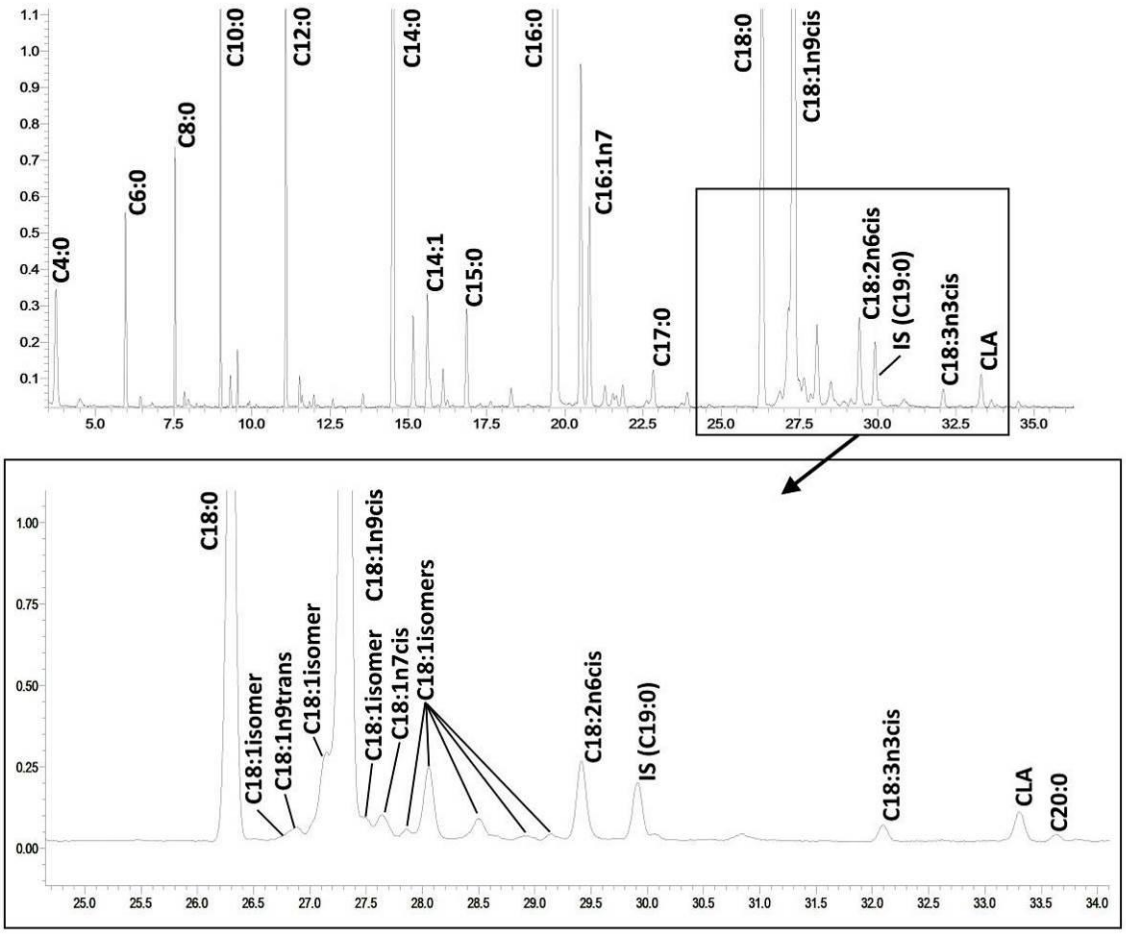
α = razina značajnosti

d.f. = stupnjevi slobode (eng. *degrees of freedom)*

3. Rezultati

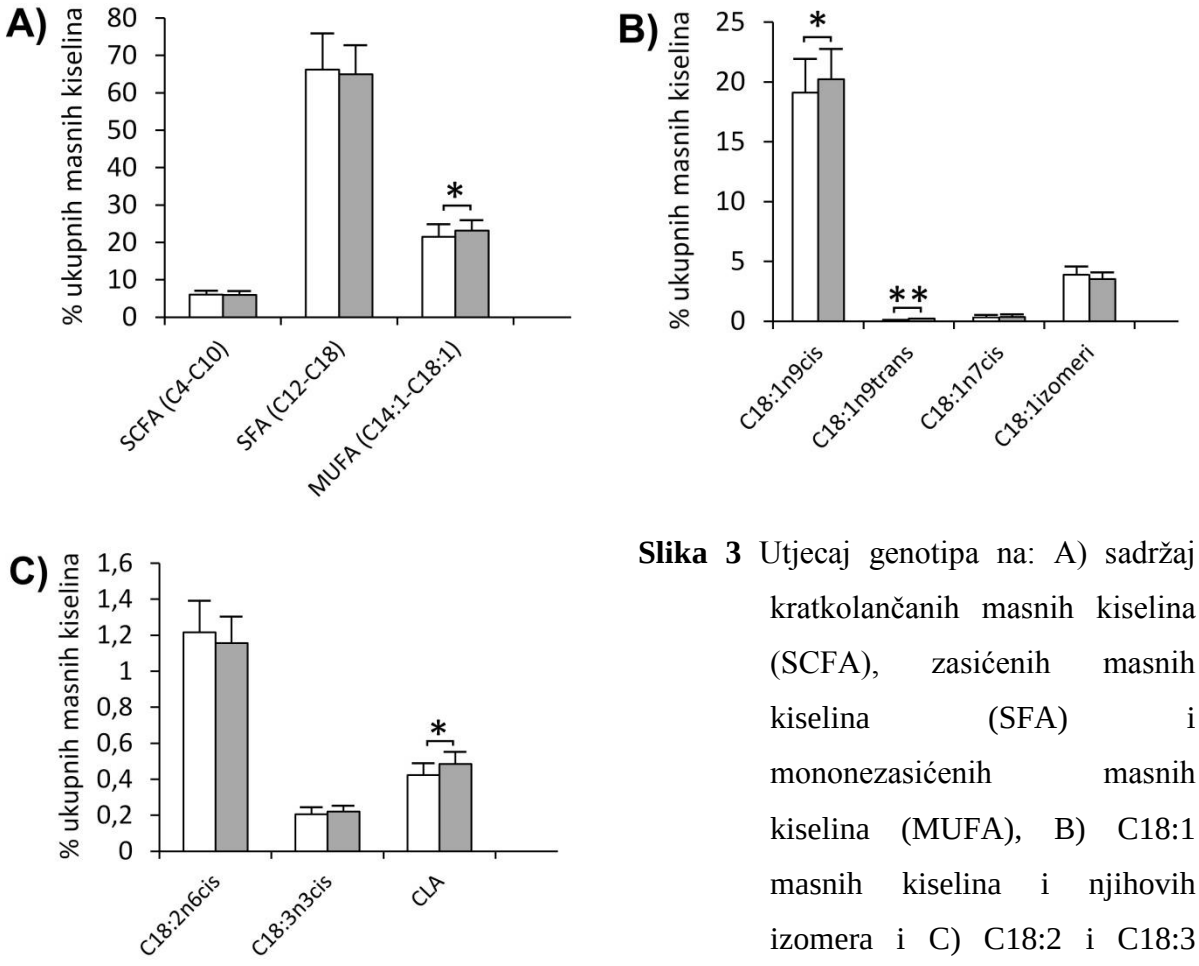
3.1 Sastav masnih kiselina

Metodom plinske kromatografije s masenom detekcijom određen je sastav masnih kiselina. Rezultati su pokazali karakterističan sastav masnih kiselina mlijeka kod svih uzoraka. Glavna karakteristika mlijeka je prisustvo velikog broja masnih kiselina (slika 2) te veliki broj C18:1 i C18:2 izomera (slika 2, izdvojeni dio).



Slika 2. Reprezentativni kromatogram uzorka mlijeka s izdvojenim segmentom C18:1 i C18:2 izomera

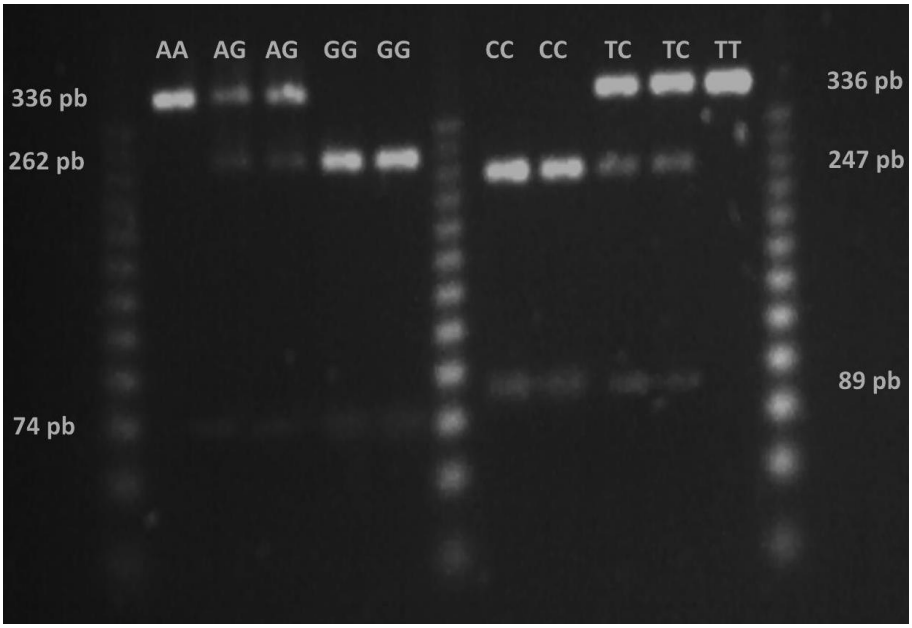
Nakon identifikacije i integracije pojedinih pikova rezultati su predstavljeni na slici 3. Polimorfizam gena FASN AR/AR (GG/CC) je imao značajno više koncentrracije mononezasićenih masnih kiselina (MUFA) (P<0,05), C18:1n9*cis* (P<0,05), C18:1n9*trans* (P<0,01) i CLA (P<0,05).



Slika 3 Utjecaj genotipa na: A) sadržaj kratkolančanih masnih kiselina (SCFA), zasićenih masnih kiselina (SFA) i mononezasićenih masnih kiselina (MUFA), B) C18:1 masnih kiselina i njihovih izomera i C) C18:2 i C18:3 masnih kiselina. *(P<0.05), **(P<0.01). □ TW/AR (AG/TC), ▩ AR/AR (GG/CC).

3.2 **Genotipizacija**

Genotipizacija SNP 5848bpA/G i 5863bpT/C provedena je metodom lančane reakcije polimerazom i restrikcije s odgovarajućim restrikcijskim endonukleazama.



Slika 4. Razdvajanje dobivenih DNK produkata nakon cijepanja restrikcijskim enzimima Nci I za FASN SNP W1955R (T>C) i Hha I za SNP 5848bpA/G (T1950A, A>G) na agaroznom gelu (3%). Restrikcijski enzim Hha I cijepa umnoženi odsječak DNK samo u prisutnosti alela G (Ala) tako da PCR produkt od 336 pb prikazuje za svaki genotip sljedeće: AA = 336 pb (nema cijepanja), AG = 336, 262 i 74 pb, GG = 262 i 74 pb. Restrikcijski enzim Nci I cijepa umnoženi odsječak DNK samo u prisutnosti alela C (Ar) tako da PCR produkt od 336 pb prikazuje za svaki genotip sljedeće: TT = 336 pb (nema cijepanja), TC = 336, 247 i 89 pb, CC = 247 i 89 pb.

S obzirom da su ova dva SNP međusobno povezana utvrđeni su odgovarajući haplotipovi i diplotipovi FASN gena u istraživanoj populaciji (tablica 3) (MATSUMOTO i sur., 2012). Promatrani SNP su nesinonmi (*non synonymous*) SNP i nalaze se u kodirajućoj regiji FASN gena te njihove mutacije dovode do izmjene pojedinih amino kiselina. Polimorfizam na SNP 5848bpA/G dovodi do zamjene treonina (T) sa alaninom (A) (mutacija T1950A), dok 5863bpT/C uzrokuje zamjenu triptofana (W) u arginin (R) (mutacija W1955R). U promatranoj populaciji utvrđeno je prisustvo samo dva haplotipa (TW i AR) te dva

diplotipa (TW/AR i AR/AR). Zastupljenost diplotipa AR/AR je 80% dok je TW/AR diplotip zastupljen samo 20% u promatranoj populaciji. Za odabranu populaciju je izračunato nalazi li se, u slučaju promatranog gena FASN za SNP-ove 5848bpA/G i 5863bpT/C, u genetskoj ravnoteži prema Hardy-Weinbergovu zakonu (tablica 3). Iz napravljenog χ^2-testa s jednim stupnjem slobode, gdje kritična vrijednost pri p=0,05 iznosi 3,84, te prema dobivenim vrijednostima može se zaključiti da su jedinke cjelokupne populacije bile u genetskoj ravnoteži (p>0,05).

Tablica 3. Učestalost haplotipova i diplotipova te provjera genetske ravnoteže za SNP-ove 5848bpA/G i 5863bpT/C FASN gena

Haplotip[1]	Učestalost	Diplotipovi[1]	N	Učestalost	χ2	P
TW(A-T)	0,1	TW/TW (AA/TT)	0	0		
		TW/AR (AG/TC)	5	0,2	0,31	P>0,05
AR (G-C)	0,9	AR/AR (GG/CC)	20	0,8		

[1] Nukleotidi, s lijeva na desno, odnosi se na alele na mutacije T1950A i W1955R, odnosno SNP 5848bpA/G i 5863bpT/C

4. Rasprava

U ovom istraživanju utvrđeni su pojedini genotipovi FASN gena za dva SNP prisutna kod ispitivanih mliječnih krava Holštajn-frizijske pasmine. Goveđi gen FASN smještena je na kromosomu 19 (BTA19). Na tom istom kromosomu je opisano nekoliko QTL-a povezanih s količinom masti u mlijeku. Zbog toga se gen FASN smatra potencijalnim kandidatnim genom za količinu i sastav masti u mlijeku (ROY i sur., 2006.; CIECIERSKA i sur., 2013.). Iz literature je poznato kako prisustvo polimorfizma na SNPovima 5848bpA/G i 5863bpT/C dovodi do nesinonimne mutacije kao i da postoji povezanost ovih dviju mutacija (MATSUMOTO i sur., 2012). Prisustvo ovih mutacija i njihova povezanost pronađena je i u našem istraživanju te je određena učestalost pojedinih haplotipova i diplotipova. Najučestaliji haplotip u našem istraživanju je AR (alel G mutacije T1950A i alel C mutacije W1955R) (0,9) što nije sukladno drugim istraživanjima kod Holštajn-frizijske pasmine gdje je naučestaliji haplotip TW (alel A mutacije T1950A i alel T SNP-a W1955R) u rasponu od 0,3 - 0,6 (MORRIS i sur., 2007; SCHENNINK i sur., 2009). Visoka genetska raznolikost je očekivana kod Holštajn- frizijske pasmine goveda zbog njihove povijesti (SHOUDA, 2006.). Raznolikost drugih ključnih gena može objasniti ove raznolikosti SNPova gena FASN. Navedeno je potrebno dodato razmotriti jer različiti SNPovi mogu biti povezani sa mutacijama.

Rezultati istraživanja provedena za ostale pasmine su bila: Jersey (0,13) (MORRIS i sur., 2007) i Hanwoo (0,16 - 0,19) (BHUIYAN i sur., 2009; OH i sur., 2012; MAHARANI i sur., 2012; YEON sur., 2013) što je u skladu s našim rezultatima. Najučestaliji diplotip kod istraživanih krava je AR/AR (0,8, genotip GG T1950A i CC W1955R), što je sukladno rezultatima BHUIYAN i sur. (2009) i OH i sur. (2012) koji navode učestalost od 0,73. Razlike u učestalosti pojedinih alela ovih SNP kod pojedine pasmine, ali i između pasmina upućuje na prisustvo genetske varijabilnosti (CIECIERSKA i sur., 2013).

Enzim sintaza masnih kiselina odogovoran je za *de novo* sintezu masnih kiselina s palmitinskom masnom kiselinom kao produktom. Mutacije T1950A i W1955R nalaze se u domeni ketoreduktaze FASN gena koja je odgovorna za redukciju β-keto skupine u β-hidroksilnu skupinu (WAKIL i sur., 1964), te time i za određivanje duljine lanca FASN produkta, koji predstavlja potencijalni substrat za elongaze i desaturaze (ZHANG i sur., 2008; MATSUMOTO i sur., 2012).

Značajno povećanje MUFA, C18:1n9*cis* i 18:1n9*trans* te CLA kod genotipa GG/CC (mutacija AR/AR) može se u našem istraživanju objasniti utjecajem alela G na povećanje aktivnosti sintaze masnih kiselina. Naime, povećanje ekspresije sintaze masnih kiselina dovodi do povećanja *de novo* sinteze masnih kiselina i do povećane količine njenog glavnog produkta: palmitinske kiseline (C16:0). Povećanjem koncentracije palmitinske kiseline raste i količina supstrata za delta-9-desaturaciju. Povećanje koncentracije C18:1n9 kod genotipa GG uz istovremeno smanjenje koncentracije C14:0 potvrđeno je već ranije na HF pasmini (SCHENNINK i sur., 2009). Supstrati za delta-9-desaturaciju su zasićene masne kiseline, ali i *trans*11 C18:1 koje nakon uvođenja dvostruke veze na 9. C atom prelaze u MUFA, odnosno u *cis*9, *trans*11 C18:2. (INOSTROZA i sur., 2013; MELE i sur., 2007). Upravo delta-9-desaturacija je ključni put metabolizma MUFA i CLA u mliječnoj žlijezdi zbog uvođenja dvostruke veze na cis Δ9 poziciju lanca srednjelančanih i dugolančanih masnih kiselina. Važnost ovog metaboličkog puta u mliječnoj žlijezdi vidljiva je u činjenici kako 70% *cis*9, *trans*11 CLA u mlijeku krava nastaje upravo ovim putem (TANIGUCHI i sur., 2004). Iako je glavni produkt FASN-a palmitinska kiselina, proizvode se i manje količine miristinske (C14) i laurinske (C12) masne kiseline. Umjesto acetil-CoA, životinjski FASN može koristiti i propionil-CoA, generirajući tada SFA s neparnim brojem C atoma. Malonil-CoA može biti zamijenjen alternativnim supstratom, metil-malonil-CoA, generirajući metil-razgranate masne kiseline (SMITH, 1995.). Sinteza srednjelančanih MK predstavlja bitan metabolički product biosinteze triacilglicerola mliječne masti. Preživači posjeduju FASN s neuobičajenim svojstvom koje omogućuje otpuštanje srednjelančanih acilnih jedinica (C6, C8 ili C10) kao završnih proizvoda. Povezanost između gena FASN i ekonoske vrijednosti mlijeka unatoč brojnim istraživanjima i dalje nije razjašnjena (NARUKAMI i sur., 2011.).

Osim FASN gena, veliku važnost za sintezu masnih kiselina zasigurno ima i gen SDC koji trenutno nije bio cilj našeg istraživanja. Li i sur. (2011) su istraživali polimorfizme gena SCD i primijetili povezanost FASN genotipova i aktivnosti Δ9D. Ovaj rezultat upućuje na nužnost istraživanja ekspresije i povezanosti velikog broja gena koji sudjeluju u lipogenezi kako bi se mogla uspješno obavljati selekcija krava HF pasmine s obzirom na količinu mliječne masti i koncentraciju pojedinih višestruko nezasićenih masnih kiselina. To svakako uključuje i modifikaciju trenutnih metoda istraživanja kako bi se mogao obuhvatiti veći broj gena.

5. Zaključci

Količina i sastav mliječne masti u mlijeku varira kod pojedinih krava hranjenih istim obrokom što upućuje na važnost genetike, odnosno određenih polimorfizama. Polimorfizam gena FASN očituje se s dva alela (A i G) i dva genotipa (AG/TC, GG/CC) dok treći mogući genotip nije bio utvrđen u ovom istraživanju (AA/TT). Razlika u učestalosti diplotipova bila je relativno velika prvenstveno kao posljedica nedostatka TW/TW (AA/TT) diplotipa. Diplotip AR/AR (GG/CC) je najučestaliji. Holštajn-frizijske krave diplotipa AR/AR (GG/CC) imaju veći udio MUFA, C18:1n9trans, C18:1n9cis i CLA. Rezultati istraživanja upućuju na važnost selekcije unutar HF pasmine obzirom na genotip FASN gena. Pri tome pažnju treba obratiti na diplotip AR/AR (GG/CC) koji pokazuje značajan utjecaj na sastav I koncentraciju masnih kiselina u mlijeku.

6. Literatura

1. BHUIYAN, M. S. A., S. L. YU, J. T. JEON, D. YOON, Y. M. CHO, E. W. PARK, N. K. KIM, K. S. KIM, J. H. LEE (2009): DNA polymorphisms in SREBF1 and FASN genes affect fatty acid composition in Korean cattle (Hanwoo). Asian-Aust. J. Anim. Sci. 22, 765-773.
2. BONANOME, A., S.M. GRUNDY (1988): Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein, New Engl. J. Med. 318 1244–1248.
3. CIECIERSKA, D., A. FROST, W. GRZESIAK, W. S. PROSKURA, A. DYBUS, A. OLSZEWSKI (2013): The influence of fatty acid synthase polymorphism on milk production traits in Polish Holstein- Friesian cattle. J. Anim. Plant. Sci. 23, 376-379.
4. COMMITTEE ON MEDICAL ASPECTS OF FOOD POLICY, in: Nutritional Aspects of Cardiovascular Disease, Report of the Cardiovascular Review Group Committee on Medical Aspects of Food Policy, Department of Health, Report on Health and Social Subjects, HMSO, London, 1994, pp. 123–144.
5. GRUMMER, R. (1991): Effect of feed on the composition of milk fat. J Dairy Sci 1991; 74:3244-3257.
6. HAUG, A., A.T. HØSTMARK, O.M. HARSTAD (2007): Bovine milk in human nutrition—a review. Lipids Health Dis. 6, 25.
7. INOSTROZA, K. B., E. S. SCHEUERMANN, N. A. SEPULVEDA (2013): Stearoyl CoA desaturase and fatty acid synthase gene polymorphisms and milk fatty acid composition in Chilean Black Friesian cows. Rev. Colomb. Cienc. Pecu. 26, 236-269.
8. JENSEN, R. (2002): The composition of bovine milk lipids. J Dairy Sci. 85:295-350.
9. KALAC, P., E. SAMKOVA (2010): The effects of feeding various forages on fatty acid composition of bovine milk fat: A review. Czech J Anim Sci. 23:521-537.
10. KOLETZKO, B., P.J. AGGETT, J.G. BINDELS, P. BUNG, P. FERRÉ, A. GIL, M.J. LENTZE, M. ROBERFROID, S. STROBEL (1998): Growth, development and differentiation: a functional food science approach. Br. J. Nutr. 80 (Suppl 1), S5–S45.
11. LI, C., N. ALDAI, M. VINSKY, M. E. DUGAN, T. A. MCALLISTER (2011): Association analyses of single nucleotide polymorphisms in bovine stearoyl-CoA desaturase and fatty acid synthase genes with fatty acid composition in commercial cross-bred beef steers. Anim. Genet. 43, 93-97.

12. MAHARANI, D., Y. JUNG, W. Y. JUNG, C. JO, S. H. RYOO, S. H. LEE, S. H. YEON, J. H. LEE (2012): Association of five candidate genes with fatty acid composition on Korean cattle. Mol. Biol. Rep. 39, 6113-6121.
13. MASSARO, M., M.A.CARLUCCIO, R. DE CATERINA (1999): Direct vascular antiatherogenic effects of oleic acid: a clue to the cardioprotective effects of the Mediterranean diet. Cardiologia 44, 507–513.
14. MASUKO, T., (1999): Lipid. Nutritional Science of Dairy Cattle (in Japanese), Dairy Japan, Tokyo, pp. 95–96.
15. MAŠEK, T., L. KRSTULOVIĆ, D. BROZIĆ, M. VRANIĆ, M. MAURIĆ, M. BAJIĆ, K. STARČEVIĆ (2014): Eur. Food Res. Technol. 238, 635–640.
16. MATSUMOTO, H., S. INADA, E. KOBAYASHI, T. ABE, H. HASEBE, S. SASAZAKI, K. OYAMA, H. MANNEN (2012): Identification of SNPs in the FASN gene and their effect on fatty acid milk composition in Holstein cattle. Livest. Sci. 144, 281-284.
17. MAURIĆ, M. (2015): Utjecaj polimorfizma gena DGAT1, FASN, PRL, BRCA1 i TRL1 na mliječnost i zdravlje mliječne žlijezde krava. . Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu. Zagreb, Republika Hrvatska.
18. MELE, M., G. CONTE, B. CASTIGLIONI, S. CHESSA, N. P. P. MACCIOTTA, A. SERRA, A. BUCCIONI, G. PAGNACCO, P. SECCHIARI (2007): Stearoyl-Coenzyme A Desaturase Gene Polymorphism and Milk Fatty Acid Composition in Italian Holstein. J. Dairy Sci. 90, 4458–4466.
19. MORRIS, C. A., N. G. CULLEN, B. C. GLASS, D. L. HYNDMAN, T. R. MANLEY, S. M. HICKEY, J. C. MCEWAN, W. S. PITCHFORD, C. D. K. BOTTEMA, M. A. H. LEE (2007): Fatty acid synthase effects on bovine adipose fat and milk fat. Mam. Gen. 18, 64-74.
20. NARUKAMI, T., S. SASAZAKI, K. OYAMA, T. NOGI, M. TANIGUCHI, H. MANNEN (2011): Effect of DNA polymorphisms related to fatty acid composition in adipose tissue of Holstein cattle. Anim. Sci. J. 82, 406–411.
21. OH, D., Y. LEE, B. LA, J. YEO, E. CHUNG, Y. KIM, C. LEE (2012): Fatty acid composition of beed is associated with exonic nucleotide variants of the gene encoding FASN. Mol. Biol. Rep. 39, 4083-4090.
22. ROY, R., L. ORDOVAS, P. ZARAGOZA, A. ROMERO, C. MORENO, J. ALTARRIBA , C. RODELLAR (2006): Association of polymorphisms in the bovine FASN gene with milk fat content. Anim. Genet. 37, 215 - 218.

23. SCHENNINK, A., H. BOVENHUIS, K. M. LEON-KLOOSTERZIEL, J. A. M. VAN ARENDONK, M. H. P. W. VISKER (2009): Effect of polymorphisms in the FASN, OLR1, PPARGC1A, PRL and STAT5A genes on bovine milk-fat composition. Anim. Genet. 40, 909-916.
24. SEGALL, J. J. (1977): Is milk a coronary health hazard? Br. Prev. Soc. Med. 31, 81–85.
25. SHOUDA, Y. (2006): Holstein–Friesian. World Farm Animal Breed Encyclopedia (in Japanese), Toyo Shorin, Tokyo, pp. 53–55.
26. SIGNORELLI, F., L. ORRÙ, F. NAPOLITANO, G. DE MATTEIS, M.C. SCATÀ, G. CATILLO, C. MARCHITELLI, B. MOIOLI (2009): Exploring polymorphisms and effects on milk traits of the DGAT1, SCD1 and GHR genes in four cattle breeds, Italy. Livestock Science 125, 74–79.
27. TANIGUCHI, M., T. UTSUGI, K. OYAMA, H. MANNEN, M. KOBAYASHI, Y. TANABE, A. OGINO, S. TSUJI (2004): Genotype of stearoyl-CoA desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle. Mam. Gen. 14, 142-148.
28. WAKIL, S. J., E. L. PUGH, F. SAUER (1964): The mechanism of fatty acid synthesis. P. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 52, 106-114.
29. WILLIAMS, C.M. (2000.): Dietary fatty acids and human health, University of Reading, Reading RG6 6AP, UK Ann. Zootech. 49 (2000) 165–180.
30. YEON, S. H., S. H. LEE, B. H. CHOI, H. J. LEE, G. W. JANG, K. T. LEE, K. H. KIM, J. H. LEE, H. Y. CHUNG (2013): Genetic variation of FASN is associated with fatty acid composition of Hanwoo. Meat Sci. 94, 133-138.
31. ZHANG, S., T. J. KNIGHT, J. M. REECY, D. C. BEITZ (2008): DNA polymorphisms in bovine fatty acid synthase are associated with beef fatty acid composition. Anim. Genet. 39, 62-70.
32. SMITH, S. (1995): The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. FASEB J. 8, 1248-1259

7. Sažetak

Antonela Čuić

Povezanost polimorfizma gena FASN s masnokiselinskim sastavom mlijeka

Istraživanje je provedeno kako bi se utvrdila povezanost polimorfizama gena FASN i sastava masnih kiselina u mlijeku kod Holštajn-frizijske pasmine goveda.

Iz ispitivanog uzorka mlijeka izdvojena je mliječna mast te je pomoću plinske kromatografije s masenom detekcijom određeni masnokiselinski sastav pomoću eksternog standard i koncentracija pojedinih masnih kiselina pomoću specifične fragmentacije. Iz mlijeka je nakon toga izolirana DNK i utvrđeni su pojedini genotipovi FASN gena za dva SNP 5848bpA/G i 5863bpT/C pomoću RFLP-PCR metode. Polimorfizam gena FASN očitovao se s dva alela (A i G) i dva genotipa AG/TC (TW/AR) i GG/CC (AR/AR). Diplotip AR/AR (GG/CC) je najučestaliji i u mlijeku se očituje većim udjelom MUFA, C18:1n9*trans*, C18:1n9*cis* i CLA.

Rezultati istraživanja upućuju na važnost selekcije unutar Holštajn-frizijske pasmine krava obzirom na genotip FASN gena. Posebnu pažnju treba obratiti na genotip GG/CC (AR/AR) koji pokazuje značajan utjecaj na koncentraciju MUFA, C18:1n9*trans*, C18:1n9*cis* i CLA u mlijeku.

Ključne riječi: sintaza masnih kiselina, polimorfizam, masnokiselinski sastav, Holštajn-frizijska pasmina krava

8. Summary

Antonela Čuić

INFLUENCE OF FASN GENE POLYMORPHISM ON THE FATTY ACID COMPOSITION IN MILK

The study was conducted to determine the association of FASN gene polymorphisms and the milk-fat composition of Holstein-Friesian cows.

Milk fat was separated and fatty acid composition was determined using gas chromatography with mass detection. Fatty acids were identified using external standard while conjugated linoleic acid was determined using characteristic fragmentation pattern. DNA was isolated from the milk samples and FASN gene genotypes were determined for two SNPs 5848bpA/G and 5863bpT/C using RFLP-PCR method. FASN gene polymorphism manifested with two alleles (A and D) and two genotype AG/TC (TW/AR) and GG/CC (AR/AR). Diplotype AR/AR (GG/CC) was the most common and the milk from the cows with that genotype had the higher concentration of MUFA, C18: 1n9*trans*, C18: 1n9*cis* and CLA.

The obtained results indicate the importance of selection within the Holstein-Friesian cows based on FASN gene genotypes. Particular attention should be paid to genotype AR/AR (GG/CC) which shows significantly higher concentrations of MUFA, C18: 1n9*trans*, C18: 1n9*cis* and CLA.

Keywords: fatty acid synthase, polymorphism, fatty acids composition, Holstein-Friesian cows

9. Životopis

Antonela Čuić rođena je 09.06.1991. godine u Livnu u Bosni i Hercegovini. Izvrsnim uspjehom završila je Osnovnu školu „Fra Mije Čuića“ u Bukovici, općina Tomislavgrad i Opću gimnaziju „Marka Marulića“ u Tomislavgradu. Fakultet veterinarske medicine u Zagrebu upisuje 2010.godine. Nakon 9. semestra opredjeljuje se za smjer Veterinarsko javno zdravstvo. Dobitnica je Sveučilišnih stipendija u kategoriji A za izvrsne studente. U prosincu 2014. godine objavila je znanstveni članak "Divlje i šumske mačke" u časopisu Moj pas. Aktivno govori engleski i francuski jezik.