

## FATTY ACID-BINDING PROTEIN (FABP3) POLYMORPHISM AND ITS ASSOCIATION STUDY IN PN<sub>X</sub>(CLWXCL) PIGS

*Klužáková E., Dvořáková V., Stupka R., Šprysl M., Čítek J., Okrouhlá M.*

*Czech University of Life Science Prague, Czech Republic*

### Abstract

H-FABP (heart fatty acid-binding protein), a member of FABP family, plays an essential role in long-chain fatty acid uptake and metabolic homeostasis. Previous studies indicated that polymorphism in H-FABP was significantly associated on the intramuscular fat content and on average daily gain in pig. The aim of this study was to investigate the effect of H-FABP (FABP3) genotypes and HaeIII site on carcass traits. The associations between FABP3 gene polymorphism and fatness traits were tested in (ČBU<sub>X</sub>ČL)<sub>X</sub>PN. It was found the opposite effect of this SNP, than in the previous studies. It was detected the effect of allele *D* on higher fatness and the effect of allele *d* on higher lean meat. The obtained results suggest that the FABP3 gene is linked with an unknown gene.

**Key Words:** FABP3, pig, polymorphism, allele

U prasat byla popsána řada oblastí QTL, jež jsou prokazatelně spojeny s řadou užitkových znaků u prasat. Tato místa byla nalezena prakticky na všech chromozomech. Jedno z QTL ovlivňující obsah tuku v linii pŕlicího řezu či obsah intramuskulárního tuku se nachází na 6 chromozomu (Óvilo et al., 2002). Na tomto chromozomu identifikovali gen FABP3, jež tvoří jednu z devíti subjednotek skupiny FABPs. Gerbens et al. (1997).

FABPs (Fatty acid binding proteins) představují vnitrobuněčné proteiny, jež mají rozhodující roli v příjmu a transportu masných kyselin (Chmurzynska, 2006). Navíc Samulin et al. (2008) uvádí, že exprese podjednotek FABP3, FABP4 a FABP5 je ovlivněna/ovlivňuje receptory PPARA a PPARG (alpha a gama) o nichž je známo, že ovlivňují metabolismus tuků, buněčnou proliferaci a diferenciaci, adipogenezi či zánětlivé pochody (Desvergne and Wahli, 1999; Gregoire et al., 1998). Tyto zjištění doplňují studie QTL u prasat (Óvilo et al., 2002; Li et al., 2010; Yue et al., 2003). Zmíněné studie uvádějí, že gen FABP3 se nachází v oblasti, která je spojena se znaky pro ukládání tuku a to v oblasti: Sw1129 – 11cM- FABP3-9.1 cM – S0228. Lze tedy předpokládat, že mutace v tomto genu (v této oblasti) mohou ovlivňovat řadu užitkových znaků. Toto tvrzení podporuje práce Gerbens et al. (1999), v níž byly identifikovány 3 SNPs genu FABP3 (jeden v 5' regulační oblasti/HinfI a dva v intronu 2/MspI a HaeIII). Autoři uvádí, že našli statisticky průkazný vliv tohoto genu na výšku tuku v linii pŕlicího řezu a obsah intramuskulárního tuku (IMT) u plemene Duroc. K podobným závěrům dospěla studie Li et al. (2010) jež uvádí, že byl nalezen vliv genu FABP3 na IMT. Dále v této studii byla nalezena odlišná hladina exprese ve svalech u jedinců s vyšším obsahem IMT. Odlišnosti exprese byly zaznamenány i u výšky tuku v linii pŕlicího řezu. Navíc Zhao et al. (2010) našli vliv tohoto genu na průměrné denní přírůstky a zastoupení

MUFA (monounsaturated fatty acids) a PUFA (polyunsaturated fatty acids). Mezi další studie, jež našli vliv tohoto genu na užitkové znaky lze jmenovat Óvilo et al. (2002), Arnyasi et al. (2006), Pang et al., (2006) či Li et al. (2006). Avšak řada prací tato zjištění nepotvrdila. Urban et al. (2002), provedli asociační studii genu FABP3/HinfI, přičemž nenalezli vliv tohoto genu na obsah IMT u plemene Large White a Landrace. K podobným závěrům dospěla i studie Nechtelberger et al. (2001), která testovala polymorfismus na intronu 2 (MspI) genu FABP3 u australské populace prasat. Navzdory pracím, jež nepotvrdili vliv genu FABP3 na znaky ukládání tuku či růstový potenciál, lze předpokládat, že tento gen má výrazný vliv na užitkové vlastnosti prasat a mohl by sloužit jako nástroj pro MAS.

Cílem této studie bylo otestovat vliv polymorfismu genu FABP3/HaeIII na užitkové vlastnosti při eliminování faktoru výživy či pohlaví u hybridní kombinace (ČBU<sub>X</sub>ČL)<sub>X</sub>PN.

### Materiál a metodika

Na pokusné testovací stanici v Ploskově Katedry speciální zootechniky ČZU v Praze byly provedeny testace jatečných prasat kombinace křížení (ČBU<sub>X</sub> ČL)<sub>X</sub>PN celkem u 158 prasat. Prasata byla ustájena v živé hmotnosti 30 kg a poražena v cca 108 kg živé hmotnosti. Výživa u všech jatečných prasat v testu probíhala podle norem potřeby živin (Šimeček et al., 2000) *ad-libitum* (114 ks) a dávkovaně (48 ks). Při porážce byl proveden běžný jatečný rozbor a odebrána krev. Po porážce zvířete byly zjištěny následující ukazatelé:

- průměrný denní přírůstek v testu (g/den),
- výška hřbetního tuku měřená nad prvním hrudním obratlem (tuk 1), nad posledním hrudním obratlem (tuk 2), nad prvním bederním obratlem (tuk 3) a průměrná výška tuku v linii pŕlicího řezu (mm),

- procento svaloviny ZP metodou dle normy ČSN 466160 (%),
- hloubka svaloviny ZP metodou (výška svalu od dorzální hrany míšního kanálku ke kraniálnímu okraji *musculus gluteus medius* - MGM) (mm),
- hloubka tuku ZP metodou (mm).

Po odebrání byla krev ošetřena chemickou látkou EDTA a následně byla izolována vysokomolekulární DNA. Pro genotypování byly navrženy vlastní primery (F: 5' CCT TCG GTG TGT TTG AGTGTC 3', R: 5' CCT ACT CCA CTT GGT CCA TAT CA 3'). Byla vytvořena reakční směs (25µl) o obsahu: 100 ng genomické DNA, standard PCR buffer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM od každého dNTP, 10 pmol primery, 2% DMSO and 1.0 U LA DNA polymerase (Top Bio, Praha, ČR). Podmínky cyklování: 2 min při 95 °C, následovalo 30 cyklů: 94 °C (1 min), 58 °C (1 min), 68 °C (1 min) a závěrečná elongace 68 °C (7 min). PCR produkt byl štěpen restričním enzymem HaeIII a získány fragmenty o délce: alela D: 114+15+639 bp a alela d: 114+15+278+361 bp.

Výsledky byly vyhodnoceny matematicko-statistickým programem SAS (9.1 institute) procedurou GLM. Byl použit model, který zahrnoval následující fixní efekty: pohlaví a výživa, jako kovarianta byla použita hmotnost jatečně upraveného těla.

$$Y_{ijkl} = \mu + a_i + b_j + c_k + \beta x_i + e_{ijkl}$$

$Y_{ijkl}$  = znak jatečné hodnoty;  $\mu$  = celkový průměr;  $a_i$  = vliv genotypu genu FABP3 ( $i = 1, 2, 3$ );  $b_j$  = vliv výživy ( $j = 1, 2$ );  $c_k$  = vliv pohlaví ( $k = 1, 2$ );  $\beta$  = regresní koeficient na hmotnost JUT  $x_i$  = hmotnost JUT;  $e_{ijkl}$  = náhodná chyba.

## Výsledky a diskuze

Byl získán fragment očekávané délky 768 bp. Alela D byla štěpena na fragmenty o délce 114+15+639 bp, zatím co alela d obsahovala štěpené místo pro restriční endonukleasu HaeIII a byla naštěpena do fragmentů o délkách 114+15+278+361 bp. Četnost genotypů u genu FABP3 byla DD=35, Dd=72 a dd=51.

Byl statisticky potvrzen vliv genu FABP3/HaeIII na výšku tuku v linii pŕlicího řezu v místě 1 ( $p < 0,02$ ) a 2 ( $p < 0,01$ ) a průměrnou výšku tuku v linii pŕlicího řezu ( $p < 0,04$ ), (Tab. 1). Nicméně našemu zjištění neodpovídá

studie Gerbens et al. (1999), kteří ve své práci publikovali, že u genotypu DD byla nalezena menší výška tuku v linii pŕlicího řezu o 6 mm oproti genotypu dd.

Vzhledem k tomu, že testování v práci Gerbenst et al. (1999) bylo provedeno na jiné populaci prasat (Duroc a Dumeco), než v předkládané studii je možné, že rozdílné výsledky mohly být způsobeny odlišným genetickým pozadím. V této studii u genotypu DD byl naměřen nejvyšší průměrný denní přírůstek 882g, avšak tyto hodnoty byly statisticky neprůkazné (Tab. 2).

Na rozdíl od publikace Nechtelberger et al. (2001) v níž autoři uvádí, že byl nalezen nejvyšší průměrný denní přírůstek u plemene Large White ve prospěch genotypu dd. Avšak ve stejné studii tito autoři zjistili u plemene Pietren rozdíl mezi genotypem DD a dd pouze 16g a vyrovnané průměry byly naměřeny i u plemene Landrase. Tyto závěry částečně odpovídají naší studii (Tab. 2).

Nelze však opomenout fakt, že řada dalších studií nalezla vliv genotypu dd na vyšší ukládání tuku a vyšší průměrné denní přírůstky (Zhao et al., 2010, Pang et al., 2006). Zhao et al. (2010) své výsledky doplňuje o studium exprese genu FABP3 a uvádí, že nejvyšší exprese byla právě u genotypu dd (u jedinců s největším obsahem intramuskulárního tuku).

Přes tyto rozdílné výsledky u studií Zhao et al. (2010) a Gerbenst et al. (1999) jsme opět zjistili trend alely D na větší ukládání tuku v jatečně upraveném těle prasete a to u hloubky tuku měřené metodou ZP (statisticky neprůkazné), (Tab. 2).

Souhlasíme s teorií Chmurzynska et al. (2007), že gen FABP3 je spojen s jiným zatím neznámým genem (mutací), jež má vliv na obsah tuku v linii pŕlicího řezu. Přičemž Chmurzynska et al. (2007) popisují, že u genu FABP3 nebyl potvrzen vliv na znaky ukládání tuku. Je tedy možné, že efekt genu FABP3 může být ovlivněn/spolupůsobit s geny PPARA, PPARG1 či PPARG2, a tím měnit vliv testované mutace v intronu 2 FABP3/HaeIII. Tuto teorii dokládá práce Samulin et al. (2008), v níž autoři publikovali společný vliv genu FABP3 a genů PPARA, PPARG1 či PPARG2 jako rozhodující faktory na regulaci metabolismu adipogeneze.

Naopak v naší studii ve prospěch alely d bylo zjištěno nejvyšší zastoupení svaloviny (60,8 %) a největší hloubka *musculus gluteus medius* (80,6 mm). Avšak Nechtelberger et al. (2001) nenalezl vliv výše zmíněného polymorfizmu na procento svaloviny.

**Tabulka 1. Asociační analýza mezi FABP3 a znaky pro ukládání tuku**

Ukazatelé	DD=35±S.D.	Dd=72±S.D.	dd=51±S.D.	P value	výživa	pohlaví
Výška hřbetního tuku (tuk1, mm)	34,71±6,51	33,94±7,55	30,32±6,19	0,02	*	**
Výška hřbetního tuku (tuk2, mm)	20,06±4,12	21,61±4,91	19,93±6,26	0,01	*	**
Výška hřbetního tuku (tuk3, mm)	27,47±6,46	24,82±4,75	23,34±5,33	0,33	**	**
Průměrná výška tuku v linii pŕlicího řezu (mm)	27,42±4,99	26,79±5,08	24,53±5,48	0,04	**	**

$p < 0,01-0,05$  \*,  $p < 0,01$  \*\*

**Tabulka 2. Asociační analýza mezi FABP3 a produkčními znaky**

Ukazatelé	DD=35±S.D.	Dd=72±S.D.	dd=51±S.D.	P value	výživa	pohlaví
Průměrný denní přírůstek (g)	882±118	834±111	860±112	0,54	**	*
Procento svaloviny (ZP, %)	58,51±3,64	59,54±3,44	60,77±3,10	0,03	**	**
Hloubka svaloviny (ZP, mm)	76,67±8,41	78,02±8,48	80,58±7,56	0,12	**	*
Hloubka tuku (ZP, mm)	14,44±5,29	13,32±4,51	12,58±3,90	0,22	**	**

p<0,01-0,05 \*, p<0,01 \*\*

## Závěr

Byl získán fragment délky 768 bp. Statisticky byl potvrzen vliv genu FABP3 na výšku tuku v linii pŕlicího řezu v místě 1 (p<0,02) a 2 (p<0,01) a průměrnou výšku tuku v linii pŕlicího řezu (p<0,04). Vliv alely *D* byl zjištěn u hloubky tuku měřené metodou ZP (statisticky neprůkazné), kde bylo zjištěno, že nejvyšších hodnoty byly naměřeny u genotypu *DD* 14,44 mm. U tohoto genotypu byly naměřeny největší průměrné denní přírůstky (882g), avšak tyto hodnoty byly statisticky neprůkazné. Naopak největší procento svaloviny bylo zjištěno ve prospěch alely *d*. Největší zastoupení svaloviny (60,8 %) bylo nalezeno u genotypu *dd*, kde zároveň byla naměřena největší hloubka *musculus gluteus medius* (80,6 mm).

## Seznam literatury

- Árnyasi M., Grindflek E., Jávora A., Lien S., 2006. Investigation of two candidate genes for meat quality traits in a quantitative trait locus region on SSC6: the porcine short heterodimer partner and heart fatty acid binding protein genes. *J Anim Breed Genet* 123: 198-203.
- Desvergne B, Wahli W, 1999. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 20: 649-688.
- Gerbens F, Rettenberger G, Lenstra JA, Veerkamp JH, te Pas MFW, 1997. Characterization, chromosomal localization, and genetic variation of the porcine heart fatty acid-binding protein. *Mamm Genome* 8:328-331.
- Gerbens F, van Erp AJM, Harders FL, Verburg FJ, Meuwissen THE, Veerkamp JH, te Pas MFW, 1999. Effect of genetic variants of the heart fatty acid-binding protein gene on intramuscular fat and performance traits in pigs. *J Anim Sci* 77: 846-852.

Gerbens F., de Koning D.J., Harders F.L., Meuwissen T.H.E., Janss L.L.G., Groenen M.A.M., Veerkamp J.H., Van Arendonk J.A.M., te Pas M.F.W., 2000. The effect of adipocyte and heart fatty acid binding protein genes on intramuscular fat and backfat content in Meishan crossbred pigs. *J. Anim. Sci.* 78:552\_559.

- Gregoire FM, Smas CM, Sul HS, 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78: 783-809.
- Chmurzynska, A., 2006. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *J. Appl. Genet.* 47: 39-48.
- Li C.L., Pan Y.C., Meng H., Wang Z.L., Huang X.G., 2006. Distributions of polymorphism of ADD1, MC4R, H-FABP gene, associated with IMF and BF in 3 populations in pig. *Yi Chuan* 28: 159-164.
- Li X., Kim W-S., Ch. S-J., Lee K-Ch., Choi H-B, Kim H-T, Choi I-Y, Kim J-J., Kim K-K, 2010. Investigation of porcine FABP3 and LEPR gene polymorphisms and mRNA expression for variation in intramuscular fat content. *Molecular Biology Reports*. DOI: 10.1007/s11033-010-0050-1 on line
- Nechtelberger D, Pires V, Solkner J, Stur I, Brem G, Mueller M, Mueller S, 2001. Intramuscular fat content and genetic variants at fatty acid-binding protein loci in Austrian pigs. *J Anim Sci* 79: 2798-2804.
- Óvilo C, Oliver A, Noguera JL, Clop A, Barragan C, Varona L, et al. 2002. Test for positional candidate genes for body composition on pig chromosome 6. *Genet Sel Evol* 34: 465-479.
- Samulin J., Berget I., Lien S., Sundvold H., 2008. Differential gene expression of fatty acid binding proteins during porcine adipogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology* 150: 147-152.
- Šimeček K., Zeman L., Heger J. 2000. Potřeba živin a tabulky výživné hodnoty krmiv pro prasata. MZLU v Brně: 124.
- Pang W.J., Bai L., Yang G.S., 2006. Relationship among H-FABP gene polymorphism, intramuscular fat content, and adipocyte lipid droplet content in main pig breeds with different genotypes in western China. *Yi Chuan Xue Bao* 33: 515-524.

- SAS<sup>®</sup> Propriety Software Release 9.01 of the SAS<sup>®</sup> systém for Microsoft<sup>®</sup> Windows<sup>®</sup>. SAS Institute Inc., Cary, NC., 2001.
- Urban T, Mikolasova R, Kuciel J, Ernst M, Ingr I, 2002. A study of associations of the H-FABP genotypes Multigene family of FABPs 9 with fat and meat production of pigs. *J Appl Genet* 43: 505–509.
- Yue G, Stratil A, Kopecny M, Schroffelova D, Schroffel J, Hojny J, et al. 2003. Linkage and QTL mapping for *Sus scrofa* chromosome 6. *J Anim Breed Genet* 120 (Suppl. 1): 45–55.
- Zhao M.S., Ren J. L., Guo L., Cheng L.M., Zhang Y., Ge R. C., Gao Z.S., 2010. Muscle lipid metabolism gene expression in pigs with different H-FABP genotypes. *Livestock Science* 128: 101-107.

Článek vznikl v rámci řešení výzkumného záměru MSM 6046070901.