

## Frekwencja wybranych polimorfizmów typu SNP w genie karboksylazy acetylo-CoA (ACACA) u owiec rasy merynos polski\*

Katarzyna Ropka-Molik<sup>1</sup>, Jan Knapik<sup>2</sup>, Marek Pieszka<sup>3</sup>

*Institut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, <sup>1</sup>Samodzielna Pracownia Genomiki, <sup>2</sup>Dział Genetyki i Hodowli Zwierząt, <sup>3</sup>Dział Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa, 32-083 Balice k. Krakowa*

### Wstęp

Konsumenci zwracają obecnie coraz większą uwagę na odpowiednią jakość mięsa oraz produktów mięsnych. Jakość mięsa i jego ilość mogą być warunkowane, oprócz różnych czynników środowiskowych, zmianami w sekwencji DNA (polimorfizmy, sekwencje mikrosatelitarne, zmienność liczby kopii genów – CNV itp.). Genetyczne podłoże ważnych z ekonomicznego punktu widzenia cech rzeźnych i jakościowych mięsa jest bardzo złożone i może być warunkowane wpływem wielu genów lub *loci* cech ilościowych (QTL). Dlatego też, poszerzenie konwencjonalnej selekcji o informacje, dotyczące molekularnego podłoża, warunkującego określoną cechę produkcyjną, może znacznie przyspieszyć postęp hodowlany i to przy niskim nakładzie kosztów. Zastosowanie takiej właśnie selekcji, wspomaganiej markerami genetycznymi (MAS), pozwoliłoby na bardziej efektywną selekcję zwierząt pod względem interesujących cech na podstawie kilku alleli jednoczesnych. Z drugiej jednak strony, właściwy wybór odpowiednich genów kandydujących, których polimorfizmy mogą wpływać na zmienność cech produkcyjnych, jest niezwykle trudny.

Jednym z głównych kierunków poprawy jakości oraz walorów prozdrowotnych mięsa

jagnięcego jest modyfikacja profilu kwasów tłuszczowych, w tym szczególnie utrzymanie właściwego stosunku kwasów tłuszczowych wielonienasyconych (PUFA) do nasyconych (SFA). U owiec, różne geny zostały wytypowane jako kandydujące, odpowiedzialne za cechy mięsności lub za jakość mięsa jagnięcego. Obecnie badane są geny kodujące białka wiążące kwasy tłuszczowe – *FABP4* (Xu i in., 2011), hormon związany z pobieraniem pokarmu oraz gospodarką lipidową organizmu – leptynę (*LEP*) (Boucher i in., 2006) czy też gen *DGATI*, zaangażowany w syntezę trójglicerydów oraz proces powstawania tkanki tłuszczowej (Xu i in., 2009).

Karboksylaza acetylo-CoA (*ACACA*, *ACC*) jest kluczowym enzymem, biorącym udział w biosyntezie nasyconych kwasów tłuszczowych (kwasu palmitynowego oraz długołańcuchowych kwasów tłuszczowych) (Kim i in., 1989; Smith i in., 2003; Leonard i in., 2004). Wykazano, że najwyższa ekspresja oraz aktywność karboksylazy acetylo-CoA występuje w tkankach, związanych z procesem lipogenezy, tzn. w wątrobie, tkance tłuszczowej oraz gruczoł mlekowym podczas laktacji. Kokarboksylaza *ACACA* jest ściśle związana z profilem kwasów tłuszczowych w mleku bydła, owiec i kóz, wpływa również na profil kwasów tłuszczowych w mięsie, decydując tym samym o jego walorach prozdrowotnych (Barber i in., 2005; Badaoui i in., 2007). Obecnie prowadzone są liczne badania, mające na celu identyfikację zmian pojedynczych nukleotydów (SNP's), które istotnie

\*Badania zostały wykonane w ramach działalności statutowej Instytutu Zootechniki PIB, nr 01-4.05.1.

wpływałyby na poziom ekspresji genu *ACACA*. U owiec wykryto wiele zmian polimorficznych w *locus* tego genu, jednak nie zbadano jednoznacznie ich wpływu na poziom aktywnego białka czy ilość transkrypty (Moioli i in., 2005; Signorelli i in., 2008).

Badanie genu, kodującego karboksylazę acetylo-CoA, który nie był dotąd badany na krajowej populacji owiec, może pozwolić na uzyskanie dokładniejszej odpowiedzi na temat uwarunkowań cech ilościowych i jakościowych mięsa jagnięcego. Dlatego też, celem przeprowadzonych badań było określenie frekwencji trzech polimorfizmów (c.1441C>T, c.1783G>T, c.1834T>C) w genie *ACACA* u owiec rasy merynos polski.

## Materiał i metody

Materiał do badań stanowiła krew pełna, pobrana do próbek z antykoagulantem EDTA od 170 owiec rasy merynos polski, pochodzących z Zakładu Doświadczalnego Instytutu Zootechniki PIB w Pawłowicach. Do momentu wykonania analiz próbki były przechowywane w temperaturze -20°C. Izolacja genomowego DNA z krwi została przeprowadzona przy użyciu zestawu Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA), zgodnie z załączonym protokołem. Ocenę ilościową i jakościową wyizolowanego kwasu nukleinowego przeprowadzono z wykorzystaniem spektrofotometru NanoDrop 2000 (ThermoScientific, Wilmington, USA). Wyizolowane DNA do momentu dalszych analiz przechowywano w temp. -20°C.

Dla wszystkich badanych osobników została przeprowadzona analiza trzech mutacji (c.1441C>T, c.1783G>T, c.1834T>C) w *locus* genu *ACACA* (NM001009256.1) metodą PCR-RFLP. Enzymy restrykcyjne dobrano przy użyciu dostępnego oprogramowania *NEBcutter v.2.0*. Skład mieszaniny reakcyjnej do reakcji PCR był następujący: 100 ng genomowego DNA, 8 mM mieszaniny dNTP, 2,5 µl 10xPCR bufor 360AmpliTaq, 2 nM MgCl<sub>2</sub>, 1,2 µl 360GC Enhancer, 0,072 U polimerazy 360AmpliTaq (Applied Biosystems, Warszawa, Polska) oraz 0,2 nM starterów. Mieszaninę uzupełniono do 10 µl sterylnej, dejonizowaną wodą.

Startery wykorzystywane do reakcji PCR (wg Garcia-Frenandez i in., 2010), enzymy

restrykcyjne oraz wielkość fragmentów otrzymanych po trawieniu zamieszczono w tabeli 1. Mieszanina reakcyjna do trawienia restrykcyjnego zawierała: 10 µl produktu PCR, 2,2 µl buforu, 0,3 µl enzymu, 7,5 µl sterylnej wody. Trawienie restrykcyjne prowadzono przez 16 h w termocyklerze firmy Biometra w temperaturze uzależnionej od rodzaju enzymu (tab. 2). Strawione produkty PCR rozdzielono w 3,5% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika Sybergreen (Invitrogen, Life Technologies, Warszawa, Polska) i zwizualizowano na aparacie *UVis Bi-Doc IT* Imagin System. Równowagę Hardy-Weinberga oraz frekwencję alleli policzono przy użyciu oprogramowania Court – lab HW Calculator.

## Wyniki

W przypadku mutacji cichej c.1441C>T, zlokalizowanej w 9 egzonie, zidentyfikowano dwa genotypy, przy czym frekwencja genotypu CT była na niskim poziomie (2%). Przeważał genotyp CC, który zaobserwowano u 98% badanych zwierząt. Podobną zależność wykazano dla dwóch mutacji – c.1783G>T oraz c.1834T>C w 11 egzonie, gdzie w obu przypadkach przeważały osobniki homozygotyczne o genotypie dzikim: GG (75%) dla zmiany c.1783G>T oraz TT (49%) dla mutacji c.1834T>C. Natomiast, zwierzęta posiadające genotypy homozygotyczne pod względem badanych polimorfizmów TT i CC charakteryzowały się niską frekwencją (kolejno 2 i 7%) (tab. 2). Badana populacja owiec rasy merynos polski znajdowała się w równowadze Hardy-Weinberga pod względem polimorfizmu c.1834T>C.

## Omówienie wyników

Mięso jagnięce charakteryzuje się wieloma prozdrowotnymi cechami, których nie posiada mięso innych gatunków zwierząt gospodarskich. Ogromne znaczenie, określające odpowiednią przydatność kulinarną i przetwórczą jagnięciny oraz jej walory prozdrowotne, ma utrzymanie właściwego stosunku kwasów tłuszczowych wielonienasyconych (PUFA) do nasyconych (SFA) i zwiększenie zawartości kwasów tłuszczowych z grupy omega-3. Najważniejsze

Tabela 1. Warunki reakcji PCR-RFLP dla trzech polimorfizmów w locus genu ACACA u owiec  
Table 1. PCR-RFLP conditions for three polymorphisms at the ACACA locus in sheep

Fragment genu ACACA gene fragment	Polimorfizm Polymorphism	PCR-RFLP			Wielkość fragmentów otrzymanych po trawieniu restrykcyjnym Size of fragments obtained by restriction digestion
		startery (wielkość produktu PCR, pz) primers (size of PCR product, bp)	enzymy restrykcyjne restriction enzyme	temperatura trawienia restrykcyjnego (°C) restriction digestion temperature (°C)	
9 egzon exon 9	c.1441C>T	FTGCCTATTGAAGTGGAAAGCAG RATCTTCTGATGCCTGCGTTG (248)	BsiEI	55	C – 213, 35 pz T – 248 pz
11 egzon exon 11	c.1783G>T	FCGGAATGATGACGGGTTCTC RACCCCAAACGTTCTTCTTGC (556)	HinPI	55	G – 304, 214, 34 pz T – 338, 214 pz
	c.1834T>C		BstDI		

Tabela 2. Frekwencja alleli oraz genotypów dla trzech analizowanych polimorfizmów w 9 i 11 egzonie genu ACACA u owiec rasy merynos polski  
Table 2. Frequency of alleles and genotypes for three polymorphisms analysed at exon 9 and 11 of the ACACA gene in Polish Merino sheep

Polimorfizm Polymorphism	Genotypy – Genotype			Allele		HWE (p-value)
	CC	CT	TT	C	T	
c.1441C>T	0,98 (167)	0,02 (3)	–	0,99	0,01	0,907
c.1783G>T	0,75 (128)	0,23 (39)	0,02 (3)	0,87	0,13	0,982
c.1834T>C	0,49 (84)	0,46 (78)	0,07 (8)	0,72	0,28	0,055

HWE – równowaga Hardy-Weinberga. W nawiasach podano ilości zwierząt w poszczególnych grupach genotypowych.  
HWE – Hardy-Weinberg equilibrium. Number of animals in different genotype groups is given in brackets.

zadania to zmniejszenie ilości średniołańcuchowych kwasów SFA, a zwiększenie PUFA i kwasu oleinowego (cis-9 C-18:1) w celu zmniejszenia ryzyka wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych (Kritchevsky i in., 2000; Steinhart i in., 1996). Obecnie prowadzone są badania w celu określenia korelacji pomiędzy genami kandydującymi, związanymi z gospodarką lipidową a gospodarczo ważnymi cechami produkcyjnymi, jak otluszczenie tuszy jagnięcej, profil kwasów tłuszczowych, zawartość tłuszczu śródmięśniowego (IMF) i marmurkowatość.

Również gen kodujący karboksylazę – CoA (*ACACA*), ze względu na pełnione funkcje, został wytypowany jako gen kandydujący do roli odpowiedzialnego za gospodarkę lipidową organizmu i tym samym związany z profilem kwasów tłuszczowych w mleku i mięsie (Moioli i in., 2007). W badaniach przeprowadzonych u owiec rasy merynos polski potwierdzono występowanie trzech mutacji, zlokalizowanych w egzonach 9 i 11 genu kodującego karboksylazę acetylo-CoA, kluczowym enzymie odpowiedzialnym za biosyntezę nasyconych kwasów tłuszczowych. Powyższe polimorfizmy zostały zidentyfikowane przez Garcia-Fernandez i in. (2010) i wytypowane jako potencjalne markery genetyczne, związane z zawartością tłuszczu w mleku owiec. Autorzy wykazali obecności aż 22 mutacji typu SNP (Single Nucleotide Polymorphism) we fragmentach kodujących genu *ACACA*, z których żadna nie powodowała zmiany sekwencji aminokwasów. Przepuszczalnie, badane polimorfizmy pozostają w nierównowadze sprzężeń z innymi mutacjami przyczynowymi, mającymi wpływ na cechy fenotypowe.

U owiec rasy merynos polski wykazano bardzo niską frekwencję zwierząt homozygotycznych TT (c.1783G>T) oraz CC (c.1834T>C), kolejno 2 i 7%. Nie zaobserwowano natomiast występowania zwierząt homozygotycznych pod względem mutacji w 9 egzonie c.1441C>T TT, podczas gdy frekwencja heterozygot wynosiła 2%. Podobne wyniki uzyskali Garcia-Fernandez i in. (2010), analizując rozkład poszczególnych alleli genu *ACACA* u 8 ras owiec. W przypadku polimorfizmu c.1441C>T frekwencja zmutowanego allelu wynosiła, w zależności od rasy, od 0,04 do 0,11, natomiast dla dwóch ras (*Castellana*, *Manchega*) nie zaobserwowano występowania badanej mutacji. Ponadto, dla rasy merynos

hiszpański autorzy potwierdzili niską frekwencję allelu T (0,04), podobnie jak wykazano w baniach własnych dla rasy merynos polski (0,01).

Analogiczne rezultaty uzyskano również dla dwóch polimorfizmów w egzonie 11, dla których frekwencja zmutowanych alleli utrzymywała się na niskim poziomie w większości badanych ras. Dla rasy merynos hiszpański Garcia-Fernandez i in. (2010) otrzymali frekwencję allelu T (c.1783G>T) na poziomie 0,12 oraz allelu C (c.1834T>C) na poziomie 0,31, co było zgodne z wynikami badań własnych, otrzymanymi dla rasy merynos polski: allel T – 0,13 oraz C – 0,28.

Prowadzone u kóz badania genu karboksylazy acetylo-CoA, który wykazuje wysoką homologię do genu *ACACA* u owiec (99%), potwierdziły niską frekwencję zmutowanych alleli dla dwóch miejsc polimorficznych, zlokalizowanych w regionie promotorowym AJ292286:1206 pz: C/T oraz 1322 pz: T/C (kolejno 13 i 4%). Ponadto, Signorelli i in. (2008) zaobserwowali istotny wpływ mutacji 1206 pz C/T na zawartość tłuszczu i białka w mleku. Z kolei, badania prowadzone u bydła potwierdziły związek genotypów oraz haplotypów w *locus* genu *ACACA* z masą półtuszy oraz kolorem mięsa (Shin i in., 2011). Interesujące wyniki asocjacji różnych wariantów genu *ACACA* z cechami użytkowymi uzyskano również u świń. Muñoz i in. (2007) wykazali istotny wpływ polimorfizmu w egzonie 44 (c.5634C>T) z profilem kwasów tłuszczowych, szczególnie zawartością kwasów stearynowego, palmitynowego oraz walcynowego w mięsie wieprzowym. Również dwie sprzężone ze sobą mutacje (c.4899G>A, c.5196T>C) w regionie kodującym genu *ACACA* były związane ze składem poszczególnych kwasów tłuszczowych w mięsie – procentową zawartością kwasów wielonienasyconych (PUFA), kwasów z grupy omega-3 i omega-6 oraz stosunkiem kwasów wielonienasyconych do nasyconych (PUFA/MUFA) (Gallardo i in., 2009).

Obiecujące wyniki, uzyskane u innych gatunków zwierząt gospodarskich sprawiają, że uzasadniona staje się analiza polimorfizmów w genie *ACACA* pod kątem ich związku z istotnymi cechami otluszczenia mięsa jagnięcego. Prace badawcze nad genem kodującym karboksylazę acetylo-CoA, który nie był dotąd badany na krajowej populacji owiec, mogą pozwolić uzy-

skać dokładniejszą odpowiedź na temat uwarunkowań cech ilościowych i jakościowych mięsa jagnięcego. Ponadto, poszerzenie konwencjonalnej selekcji o informacje, dotyczące molekularne-

go podłoża, warunkującego między innymi profil kwasów tłuszczowych, czyli tym samym walory prozdrowotne mięsa, może znacznie przyspieszyć postęp hodowlany, przy niskim nakładzie kosztów.

### Literatura

- Badaoui B., Serradilla J.M., Tomàs A., Urrutia B., Ares J.L., Carrizosa J., Sánchez A., Jordana J., Amills M. (2007). Goat acetyl-coenzyme A carboxylase  $\alpha$ : Molecular characterization, polymorphism, and association with milk traits. *Amer. Dairy Sci.*, 90 (2): 1039–1043.
- Barber M.C., Price N.T., Travers M.T. (2005). Structure and regulation of acetyl-CoA carboxylase genes of metazoa. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1733: 1–28.
- Boucher D., Palin M.F., Castonguay F., Gariépy C., Pothier F. (2006). Detection of polymorphisms in the ovine leptin (*LEP*) gene: Association of a single nucleotide polymorphism with muscle growth and meat quality traits. *Can. J. Anim. Sci.*, 86: 31–35.
- Gallardo D., Quintanilla R., Varona L., Díaz I., Ramírez O., Pena R.N., Amills M. (2009). Polymorphism of the pig acetyl-coenzyme A carboxylase; gene is associated with fatty acid composition in a Duroc commercial line. *Anim. Genet.*, 40: 410–417.
- Garcia-Frenandez M., Gutierrez-Gil B., Garcia-Gamez E., Arranz J. (2010). Identification of single nucleotide polymorphisms in the ovine acetyl-CoA carboxylase-alpha gene. *Small Rumin. Res.*, 90: 34–40.
- Kim K.H., Lopez-Casillas F., Bai D.H., Luo X., Pape M.E. (1989). Role of reversible phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase in long-chain fatty acid synthesis. *FASEB J.*, 3: 2250–2256.
- Kritchevsky D., Tepper S.A., Wright S., Tso P., Czarnecki S.K. (2000). Influence of conjugated linoleic acid (CLA) on establishment and progression of atherosclerosis in rabbits. *J. Amer. Coll. Nutr.*, 19 (4): 472–477.
- Leonard A.E., Pereira S.L., Sprecher H., Huang Y.S. (2004). Elongation of long-chain fatty acids. *Prog. Lipid Res.*, 43: 36–54.
- Moioli B., Napolitano F., Orru L., Catillo G. (2005). Single nucleotide polymorphism detection in promoter I of the acetyl-CoA carboxylase gene in sheep. *Small Rumin. Res.*, 59: 49–53.
- Moioli B., D'Andrea M., Pilla F. (2007). Candidate genes affecting sheep and goat milk quality. *Small Rumin. Res.*, 68: 179–192.
- Muñoz G., Alves E., Fernández A., Ovilo C., Baragán C., Estellé J., Quintanilla R., Folch J.M., Silió L., Rodríguez M.C., Fernández A.I. (2007). QTL detection on porcine chromosome 12 for fatty-acid composition and association analyses of the fatty acid synthase, gastric inhibitory polypeptide and acetyl-coenzyme A carboxylase alpha genes. *Anim. Genet.*, 38: 639–646.
- Shin S.C., Heo J.P., Chung E.R. (2011). Effect of Single Nucleotide Polymorphisms of Acetyl-CoA Carboxylase  $\alpha$  (ACACA) gene on carcass traits in Hanwoo (Korean cattle). *Asian-Austr. J. Anim. Sci.*, 24 (6) : 744–751.
- Signorelli F., Napolitano F., Matteis G. de, Scatà M.C., Catillo G., Tripaldi C., Moioli B. (2008). Identification of Novel Single Nucleotide Polymorphisms in Promoter III of the Acetyl-CoA Carboxylase- $\alpha$  gene in goats affecting milk production traits. *J. Heredity*, 100 (3): 386–389.
- Smith S., Witkowski A., Joshi A.K. (2003). Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Prog. Lipid Res.*, 42: 289–317.
- Steinhart H., Rickert R., Winkler K. (1996). Identification and analysis of conjugated linoleic acid isomers (CLA). *Europ. J. Med.*, 20 (8): 370–372.
- Xu Q.L., Chen Y.L., Ma R.X., Xue P. (2009). Polymorphism of *DGATI* associated with intramuscular fat-mediated tenderness in sheep. *J. Sci. Food Agric.*, 89: 232–237.
- Xu Q.L., Tang G.W., Zhang Q.L., Huang Y.K., Liu Y.X., Quan K., Zhu K.Y., Zhang C.X. (2011). The *FABP4* gene polymorphism is associated with meat tenderness in three Chinese native sheep breeds. *Czech J. Anim. Sci.*, 56 (1): 1–6.

**FREQUENCY OF SELECTED SNP POLYMORPHISMS IN THE ACETYL-COA CARBOXYLASE GENE (*ACACA*) IN POLISH MERINO SHEEP**

**Summary**

Acetyl-CoA carboxylase (*ACACA*, *ACC*) is a key enzyme involved in biosynthesis of saturated fatty acids (palmitic acid and long-chain fatty acids). The aim of the study was to determine the frequency of three polymorphisms (c.1441C>T, c.1783G>T, c.1834T>C) in the *ACACA* gene in Polish Merino sheep. Analysis was performed with 117 Polish Merino sheep from the Experimental Station in Pawłowice, belonging to the National Research Institute of Animal Production. For all animals, DNA was isolated from whole blood collected into EDTA tubes. The polymorphisms were determined by PCR-RFLP. Two genotypes were identified for the silent mutation c.1441C>T localized in exon 9, but the frequency of CT genotype was low (3%). The predominant genotype was CC, which was observed in 97% of the animals. A similar relationship was found for the two mutations c.1783G>T and c.1834T>C in exon 11, where homozygous animals of the wild-type genotype predominated in both cases: GG (71%) for c.1783G>T substitution and TT (55%) for c.1834T>C mutation. In turn, animals with heterozygous genotypes for the analysed TT and CC polymorphisms were characterized by low frequency (6% and 7%, respectively). Research concerning the gene encoding acetyl-CoA carboxylase, which has never been investigated in the Polish population of sheep, could help to gain more insight into determinants of the quantitative and qualitative traits of lamb meat.



Fot.: B. Borys