

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET**

ANTONELA ČUIĆ

**UTJECAJ POLIMORFIZMA GENA FASN NA KONCENTRACIJU
KONJUGIRANE LINOLNE KISELINE U MLIJEKU**

**STUDENSKI RAD
ZAGREB, 2016.**

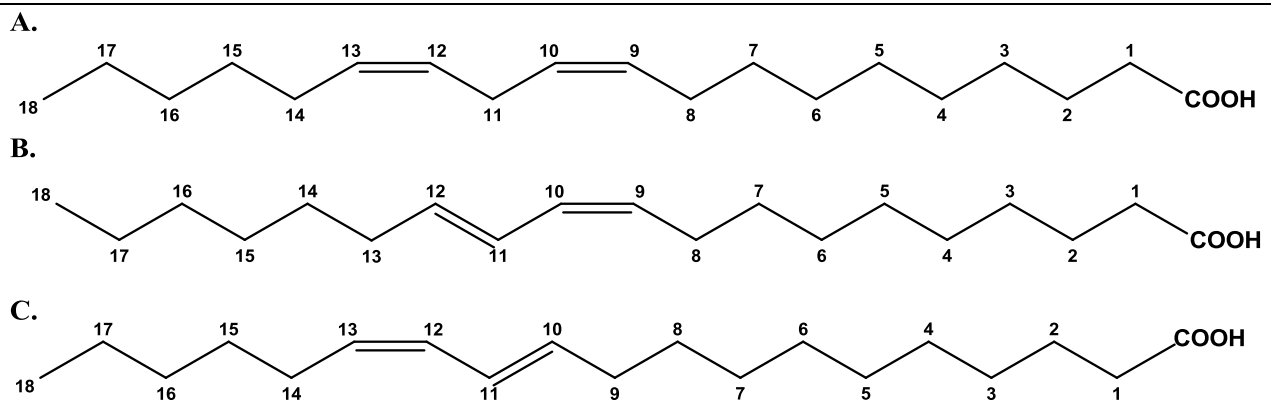
Ovaj rad izrađen je na Zavodu za stočarstvo i Zavodu za prehranu i dijetetiku životinja, pod vodstvom dr. sc. Kristine Starčević i izv. prof. dr. sc. Tomislava Mašeka i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade akademske godine 2015/2016.

SADRŽAJ

1. Uvod	1
2. Hipoteza	4
3. Opći i specifični ciljevi rada.....	4
4. Materijali i metode	5
4.1. Životinje	5
4.2. Određivanje sastava masnih kiselina	5
4.3. Izolacija genomske DNK iz uzoraka mlijeka.....	6
4.4. Metoda lančane reakcije polimerazom i restrikcija s odgovarajućim restrikcijskim endonukleazama (PCR - RFLP metoda)	7
4.5. Statistička obrada podataka.....	8
5. Rezultati	9
5.1. Genotipizacija	9
5.2. Sastav masnih kiselina	10
6. Rasprava.....	12
7. Zaključci	14
8. Zahvale.....	15
9. Literatura.....	15
10. Sažetak	19
11. Summary	20

1. Uvod

Mlijeko preživača, kao namirnica u prehrani ljudi, je tijekom 1950tih prvi puta povezana s promjenama u sastavu lipida plazme te ubrzo nakon toga i sa štetnim posljedicama na ljudsko zdravlje (SEGALL, 1977.). Najproučavaniji čimbenici štetnosti su netolerancija na laktozu i hiperkolesterolemijski učinak visokih količina miristinske i palmitinske masne kiseline. Kao posljedica 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.). Usporedno s ovim istraživanjima javljaju se i novi podaci o pozitivnim učincima pojedinih masnih kiselina na zdravlje ljudi, posebice dugolančanih n3 masnih kiselina: eikozapentaenske i dokozaheksaenske. Nakon njih i konjugirana linolna masna kiselina (CLA) postaje predmetom istraživanja sa svojim brojnim novotkrivenim svojstvima.



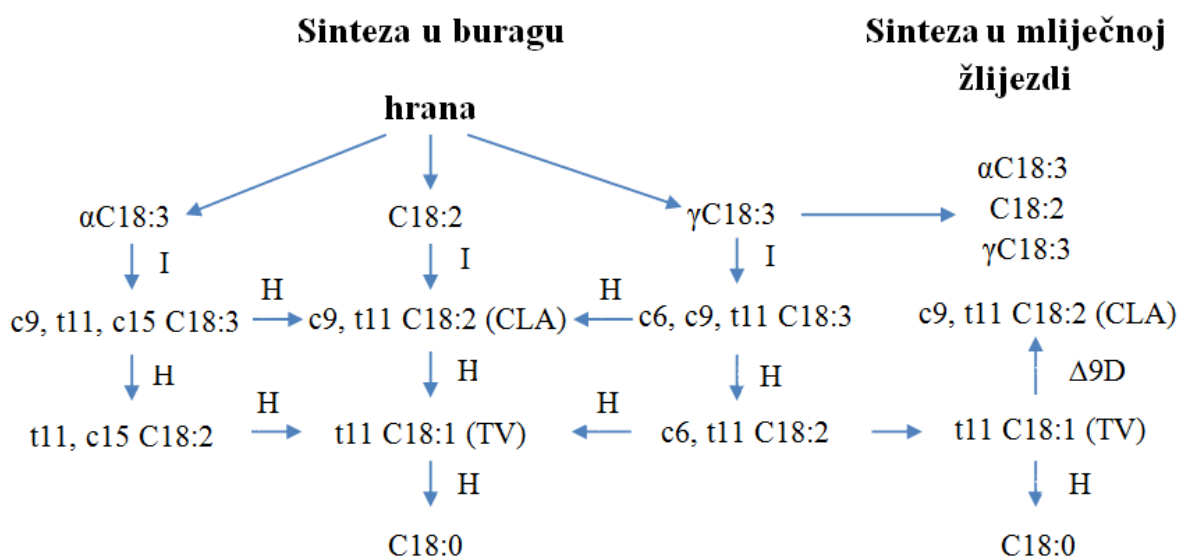
Slika 1. Prikaz kemijske strukture *cis*9, *cis*12 C18:2 (A), izomera *cis*9, *trans*11 C18:2 (B) i izomera *trans*10, *cis*12 C18:2 (C).

Konjugirana linolna kiselina (eng. *conjugated linoleic acid*, CLA) zajednički je naziv za skupinu pozicijskih i geometrijskih izomera linolne kiseline (C18:2n6) (AYDIN i sur., 2005.). Najvažniji izvor CLA je hrana podrijetlom od preživača, gdje je u najvećoj koncentraciji zastupljena u mlijeku i mliječnim proizvodima te u manjim količinama i u drugim tkivima (AYDIN i sur., 2005.). CLA posjeduje čitav niz pozitivnih svojstava koja se mogu sumirati u:

antikancerogena (BHATTACHARYA i sur., 2006.; KELLEY i sur., 2007.; IP i sur., 1997.), protuupalna (BHATTACHARYA i sur., 2006.; BASSAGANYA-RIERA i sur., 2002.) i kontrolu rasta koštanog sustava i tjelesne mase (MURPHY i sur., 2006.; PARK i sur., 2008.; PARK i PARIZA, 2007.).

Posebna zanimljivost CLA je različito biološko djelovanje na zdravlje ljudi i životinja kod različitih izomera. Najzastupljeniji CLA izomer u hrani s pozitivnim svojstvima je *cis*9, *trans*11 C18:2 zbog čega mu se pridaje najveća pozornost. Zbog toga se i sam termin CLA najčešće odnosi upravo na ovaj izomer pa će to značenje imati i u našem radu. Strukture *cis*9, *cis*12 C18:2 i najzastupljeniji izomeri prikazani su na slici 1.

Količina CLA u mlijeku i mliječnim proizvodima varira ovisno o hranidbi (količina preteča CLA u hrani za životinje), pasmini, načinu držanja kao i o procesima proizvodnje i tehnološkoj obradi (FRITSCHKE i sur., 1998.).



Slika 2. Sinteza CLA u buragu i mliječnoj žlijezdi (BAUMAN i sur., 1999.).

Biosinteza CLA u preživača događa se u većem obimu u buragu i u tkivu mliječne žlijezde (slika 2.) (BAUMAN i sur., 1999.). Glavni put sinteze u buragu je biohidrogenacija linolne masne kiseline enzimom linoleat izomerazom koji proizvodi bakterija *Butyrivibrio fibrisolvens*. Pri tome nastaje prvi međuprodukt *trans* izomer *cis*9, *trans*11 CLA (KEPLER i

TOVE, 1967.; ELLEN i ELGERSMA, 2004.; DESTAILLATS i sur., 2005.). Druge bakterije također sudjeluju u stvaranju različitih izomera svojim izomerazama i reduktazama. Izomer *cis*9, *trans*11 C18:2 brzo prelazi u *trans* vakensku (TV) ili stearinsku kiselinu (C18:0). TV uobičajeno nastaje biohidrogenacijom linolne (C18:2n6) i linolenske kiseline (C18:3n3) u buragu. Ovisno o hrani i biohidrogenaciji u buragu, CLA i TV mogu se apsorbirati iz tankog crijeva i tako postati supstrat za endogenu sintezu. U mliječnoj žlijezdi sinteza CLA iz TV događa se djelovanjem enzima delta-9-desaturaze (Δ 9D) koji uvodi dvostruku vezu na 9. C atom lanca masne kiseline (ELLEN i ELGERSMA, 2004.; DESTAILLATS i sur., 2005.). Endogena sinteza CLA iz TV glavni je način sinteze CLA u mliječnoj masti (GRIINARI i sur., 2000.; CORL i sur., 2001.).

Proizvodnju i sastav mlijeka kontrolira više različitih gena. 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. Gen FASN kodira enzim sintazu masnih kiselina koji je multifunkcionalni 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.). 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.).

Obzirom na pozitivan utjecaj CLA na zdravlje čovjeka te nastojanja da se poveća njezina količina u mlijeku, cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi postoji li povezanost polimorfizama gena FASN i količine konjugirane linolne kiseline u mlijeku kod holštajn-frizijske pasmine goveda.

2. Hipoteza

Gen FASN kodira multifunkcionalni enzim sintazu masnih kiselina koji je odgovoran za sintezu masnih kiselina u tkivima. Pretpostavljamo kako zbog svoje funkcije polimorfizmi gena FASN mogu utjecati na sintezu konjugirane linolne kiseline (CLA) te da pojedini genotipovi mogu biti povezani s porastom njene koncentracije u mlijeku. Pojava takvog učinka može biti objašnjena utjecajem određenog polimorfizma na *de novo* lipogenezu i povećanje koncentracije supstrata za $\Delta 9$ desaturaciju, te na taj način i na povećanje koncentracije konjugirane linolne kiseline u mlijeku preživača.

3. Opći i specifični ciljevi rada

Zbog pozitivnih svojstava CLA, trenutni trend u znanosti je povećanje količine CLA u tkivima i naročito mlijeku preživača. Osim hranidbe koja je trenutno najproučavaniji način za manipulaciju koncentracije CLA, u velikom porastu je i proučavanje utjecaja genotipa. Ciljevi našeg rada uključuju: A) utvrđivanje polimorfizama FASN gena pomoću RFLP-PCR metode, B) formiranje metode za analizu CLA pomoću plinske kromatografije s masenom detekcijom (GC-MS) i C) utvrđivanje povezanosti pojedinih FASN genotipova s koncentracijom CLA u mlijeku. Dobiveni rezultati dovest će do potvrđivanja značaja genotipa za razinu CLA u mlijeku preživača te time omogućiti daljnja istraživanja u selekciji životinja za dobivanje značajnijih koncentracija CLA u sirovom mlijeku. Dodatno, rezultati ovog rada predstavljaju preliminarno istraživanje u svrhu dobivanja mliječnih proizvoda koji će pozitivno utjecati na zdravlje ljudi kao funkcionalna hrana.

4. Materijali i metode

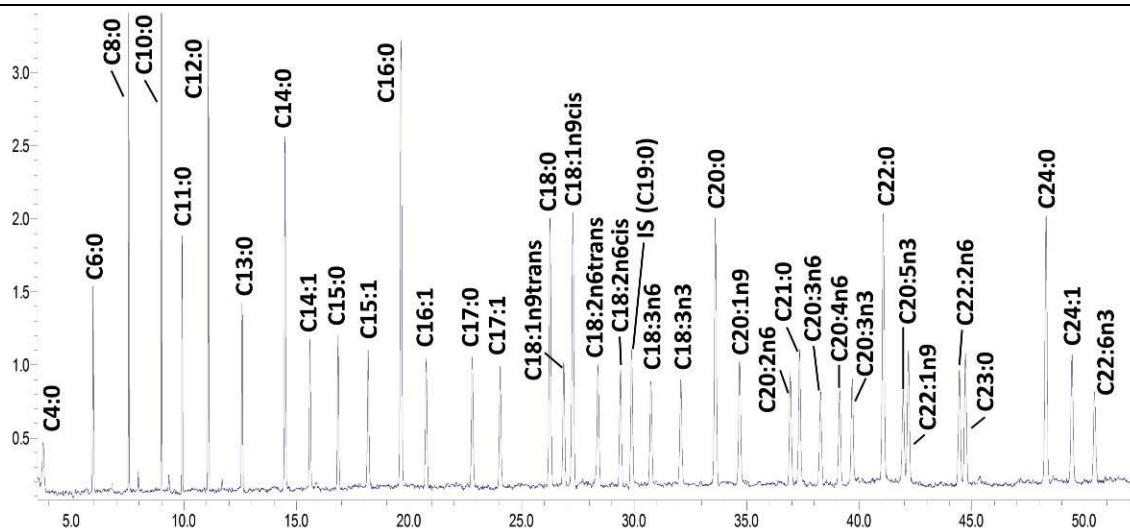
4.1. Životinje

Istraživanje je provedeno na farmi mliječnih krava holštajn-frizijske (HF) pasmine. Istraživanjem je obuhvaćeno 25 mliječnih krava u drugoj i trećoj laktaciji. Životinje su držane 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 °C do daljnje obrade u laboratoriju.

4.2. 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. 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 3. Pojedine masne kiseline identificirane su primjenom eksternog standarda (37 component FAME mix, Supelco) te pomoću specifičnih fragmenata elektronske ionizacije (slika 3.). Kao interni standard korištena je C19:0.



Slika 3. Reprezentativni kromatogram eksternog standarda korištenog za identifikaciju masnih kiselina (37 component FAME mix, Supelco). Kolona: BPX70 (0.25 mm promjer, 0.25 μ m 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.

4.3. Izolacija genomske DNK iz uzoraka mlijeka

DNK je iz mlijeka izolirana pomoću komercijalnog kita PathoProof™ DNA Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Finska) (MAURIĆ, 2015.). Prilikom izolacije DNK uzeta je količina od 350 μ L homogeniziranog sirovog mlijeka. Koncentracija i čistoća dobivene DNK očitana je na spektrofotometru BioDrop μ LITE (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.

4.4. 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. <i>Primers</i>)	Literatura
FASN	5848bpA/G (T1950A)	F: (5' – CTA CCA AGC CAG GCA GGT C - 3')	MATSUMOTO i sur. (2012.)
	5863bpT/C (W1955R)	R: (5' – GCC ATT GTA CTT GGG CTT GT - 3')	

*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/90V) 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, eng. *restriction fragment length polymorphism*) koristi restriksijske endonukleaze u reakciji cijepanja odsječaka DNK s ciljem otkrivanja polimorfizama u jednom nukleotidu (SNP, eng. *single nucleotide polymorphism*). Odabrane endonukleaze i njihova restriksijska mjesta dana su u tablici 2.

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

Gen	SNP (Mutacija)	Restriksijska endonukleaza	PCR odsječak (pb)	Genotip	Restriksijski odsječci (pb)
FASN	5848bpA/G (T1950A)	<i>Nci</i> I (<i>Bcn</i> I) (Takara Bio Inc., Japan)	336	AA	336
				AG	336, 262, 74
				GG	262, 74
				TT	336
				TC	336, 247, 89
				CC	247, 89

Reakcija cijepanja umnoženih odsječaka DNK provedena je u restriksijskoj smjesi volumena 10 µL koja se sastojala od: PCR produkta, odgovarajuće endonukleaze i pripadajućeg pufera. Restriksijska smjesa je zatim inkubirana na temperaturi od 37 °C u termobloku (Dry Bath Incubator, STARLAB International GmbH, Njemačka) tijekom 3 do 10 sati. Restriksijski 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.

4.5. Statistička obrada podataka

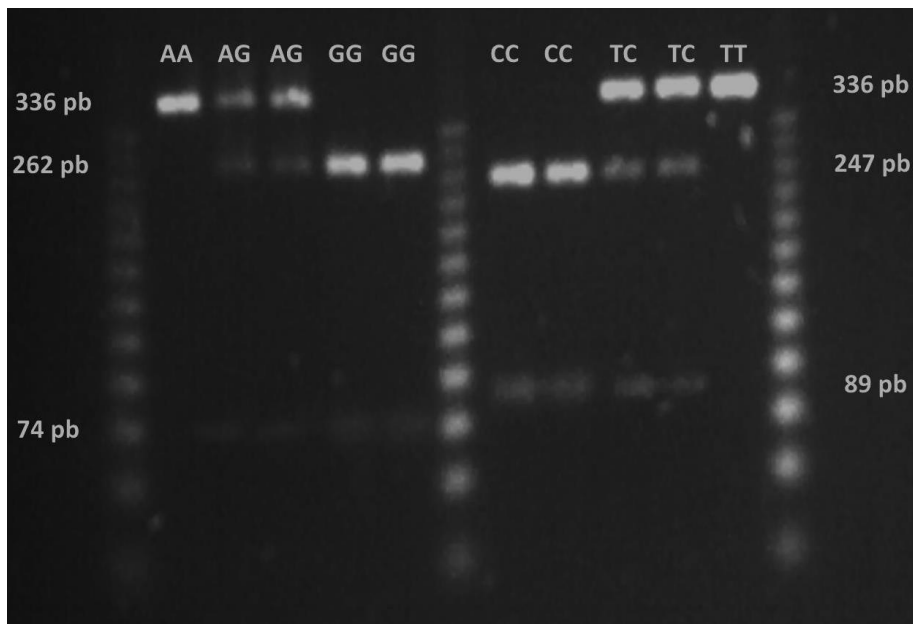
Podaci su analizirani primjenom statističkog programa Statistica 12 (Statistica, Tulsa, OK, USA). Prije utvrđivanja statističkih značajnosti razlika, svi podaci su testirani na normalnost distribucije primjenom Shapiro-Wilks testa. Svi rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i standardna pogreška.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

su POPGENE32 programom 1.32 (YEH i sur., 2000.). Ravnoteža promatranih učestalosti genotipova je provjerena u skladu s Hardy-Weinbergovim zakonom.

5. Rezultati

5.1. Genotipizacija

Genotipizacija SNP 5848bpA/G i 5863bpT/C provedena je metodom lančane reakcije polimerazom i restrikcije s odgovarajućim restrikcijskim endonukleazama (slika 4.).



Slika 4. Razdvajanje dobivenih DNK produkata nakon cijepanja restrikcijskim enzimima *Nci I* za FASN SNP 5863bpT/C (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 ($p>0,05$).

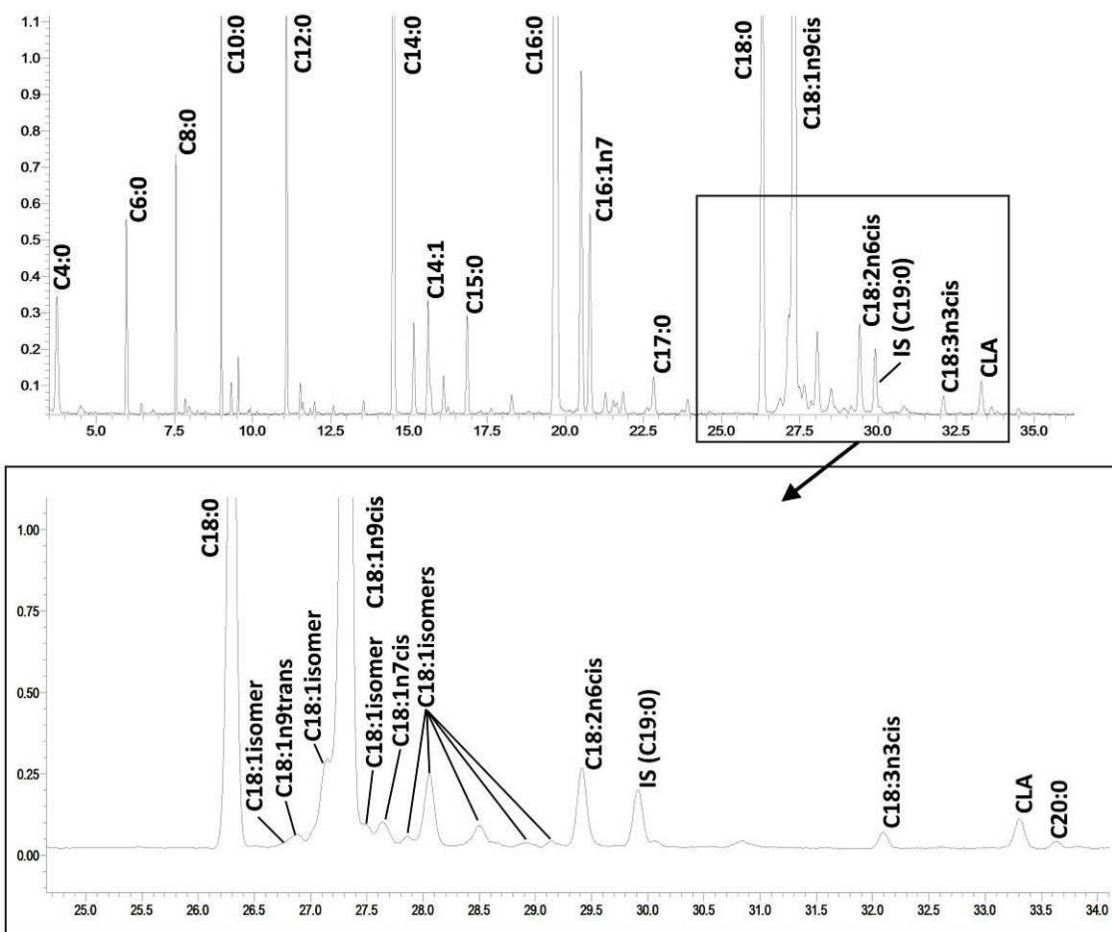
Tablica 3. Učestalost alela i genotipova te provjera genetske ravnoteže za SNP-ove 5848bpA/G i 5863bpT/C FASN gena.

Aleli ¹	N	Učestalost	Genotipovi ¹	N	Učestalost	χ^2	P
TW(A-T)	5	0,1	TW/TW (AA/TT)	0	0	0,31	P>0,05
AR (G-C)	45	0,9	TW/AR (AG/TC)	5	0,2		
			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, prema ABE i sur. (2009.).

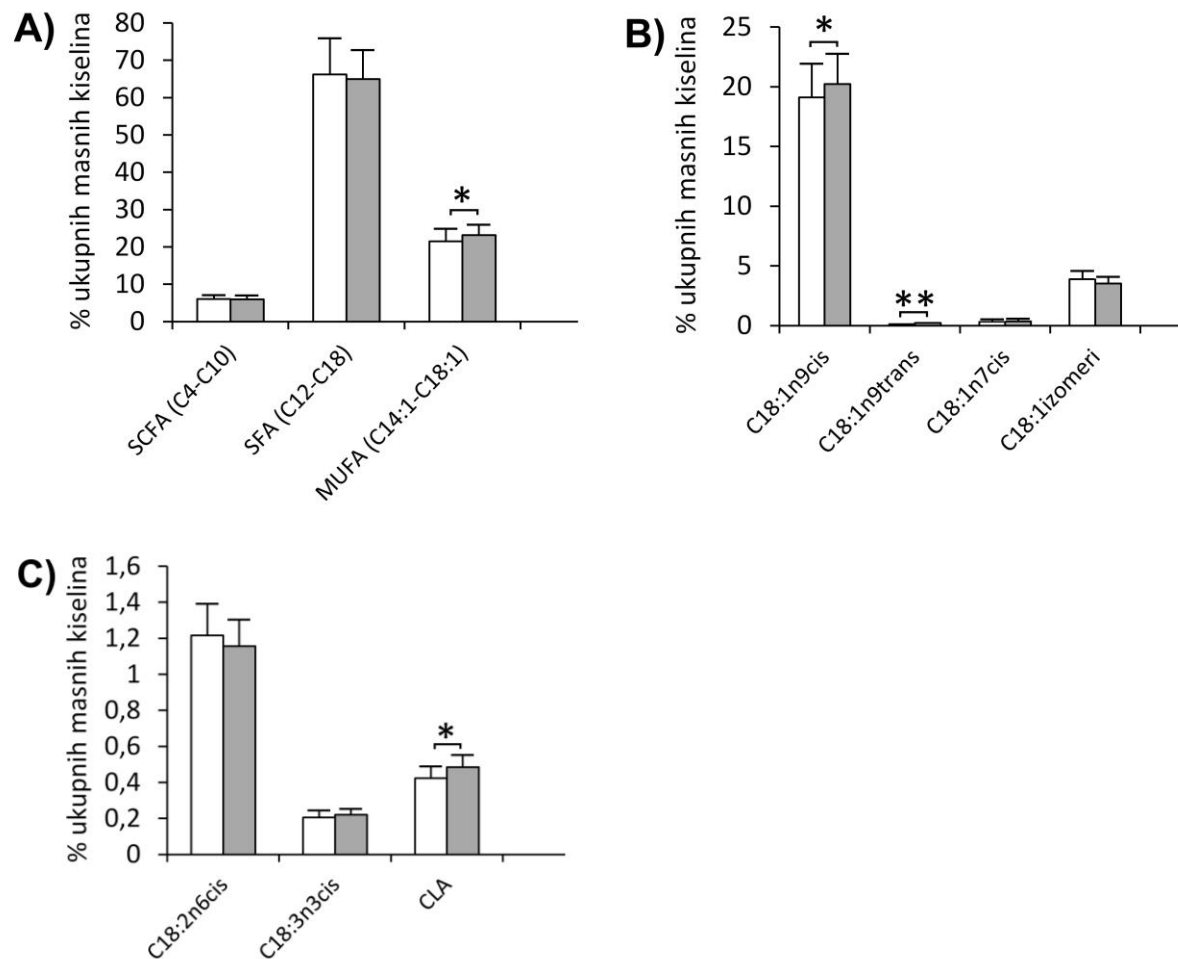
5.2. Sastav masnih kiselina

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 5.) te veliki broj C18:1 i C18:2 izomera (slika 5., izdvojeni dio).



Slika 5. Reprezentativni kromatogram uzorka mlijeka s izdvojenim segmentom C18:1 i C18:2 izomera.

Nakon identifikacije i integracije pojedinih pikova rezultati su predstavljeni na slici 6. Polimorfizam gena FASN AR/AR (GG/CC) je imao značajno više koncentracije mononezasićenih masnih kiselina (MUFA) ($P < 0,05$), C18:1n9cis ($P < 0,05$), C18:1n9trans ($P < 0,01$) i CLA ($P < 0,05$).



Slika 6. 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). Stupci pokazuju srednju vrijednost plus jedna standardna devijacija.

6. Rasprava

U ovom istraživanju utvrđeni su pojedini genotipovi FASN gena za dva SNP 5848bpA/G i 5863bpT/C prisutna kod ispitivanih mliječnih krava. Iz literature je poznato kako prisustvo polimorfizma na ovim SNP dovodi do nesinonimne mutacije kao i da postoji povezanost ovih dviju mutacija (ABE i sur., 2009.; 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 najučestaliji 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.). Rezultati istraživanja provedena za ostale pasmine su: 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.).

Razlike u količini CLA variraju kod pojedinih krava hranjenih istim obrokom što direktno dokazuje značaj genotipa pri definiranju koncentracija CLA u tkivima i mlijeku preživača (INOSTROZA i sur., 2013.). Prateći metaboličke puteve sinteze CLA u buragu i mliječnoj žlijezdi, dva najizglednija gena koja bi mogla utjecati na koncentracija CLA u mlijeku su FASN i SCD (kodira $\Delta 9D$).

Enzim sintaza masnih kiselina odgovoran 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* Δ 9 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.).

Osim FASN gena, veliku važnost za sintezu CLA zasigurno ima i gen SCD koji trenutno nije bio cilj našeg istraživanja. LI i sur. (2011.) su istraživali polimorfizme gena SCD i primijetili povezanost FASN genotipova i aktivnosti Δ 9D. 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, među kojima je i CLA. To svakako uključuje i modifikaciju trenutnih metoda istraživanja kako bi se mogao obuhvatiti veći broj gena.

7. Zaključci

Količina CLA u mlijeku varira kod pojedinih krava hranjenih istim obrokom što upućuje na važnost genotipa, 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 koncentraciju CLA u mlijeku.

8. Zahvale

Ovim putem zahvaljujemo se dr. sc. Maji Maurić za pomoć pri izradi ovog rada i dozvolu za korištenje uzoraka mliječne masti.

9. Literatura

1. ABE T., J. SABURI, H. HASEBE, T. NAKAGAWA, S. MISUMI, T. NADE, H. NAKAJIMA, N. SHOJI, M. KOBAYASHI, E. KOBAYASHI (2009): Novel Mutations of the FASN Gene and Their Effect on Fatty Acid Composition in Japanese Black Beef. *Biochem. Genet.* 47, 397–411.
2. AYDIN, R. (2005): Conjugated linoleic acid: chemical structure, sources and biological properties. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 29, 189-195.
3. BASSAGANYA-RIERA, J., R. HONTECILLAS, D. C. BEITZ (2002): Colonic anti-inflammatory mechanisms of conjugated linoleic acid. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Lothian)* 21, 451–459.
4. BAUMAN, D. E., L. H. BAUMGARD, B. A. CORL, J. M. GRIINARI (1999): Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminant. *Proc. Am. Soc. Anim. Sci.* 1-15.
5. BHATTACHARYA, A., J. BANU, M. RAHMAN, J. CAUSEY, G. FERNANDES (2006): Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *J. Nutr. Biochem.* 17, 789–810.
6. 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.
7. 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.

8. CORL, B. A., L. H. BAUMGARD, D. A. DWYER, J. M. GRIINARI, B. S. PHILLIPS, D. E. BAUMAN (2001): The role of delta(9)-desaturase in the production of cis-9, trans-11 CLA. *J. Nutr. Biochem.* 12, 622-630.
9. DESTAILLATS, F., C. JAPOIT, P. Y. CHOUINARD, J. ARUL, P. ANGERS (2005): Short communications: Rearrangement of rumenic acid in ruminant fats: a marker of thermal treatments. *J. Dairy Sci.* 88, 1631-1635.
10. ELLEN, G., A. ELGERSMA (2004): Letter to the editor: Plea for using the term n-7 fatty acids in place of C18:2 cis-9, trans-11; and C18:1 trans 11 or their trivial names Rumenic acid and Vaccenic acid rather than the generic term conjugated linoleic acids. *J. Dairy Sci.* 87, 1131.
11. FRITSCHER J., H. STEINHART (1998): Analysis, occurrence and physiological properties of trans fatty acids (TFA) with particular emphasis on conjugated linoleic acid isomers (CLA) – a review. *Lipid.* 100, 190–210.
12. GRIINARI, J. M., B. A. CORL, S. H. LACY, P. Y. CHOUINARD, K. V. V. NURMELA, D. E. BAUMAN (2000): Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Δ^9 -desaturase. *J. Nutr.* 130, 2285-2291.
13. 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.
14. IP, C., C. JIANG, H. J. THOMPSON, J. A. SCIMECA (1997): Retention of conjugated linoleic fibrisolvens. *J. Biol. Chem.* 242, 5686-5692.
15. KELLEY, N. S., N. E. HUBBARD, K. L. ERICKSON (2007): Conjugated linoleic acid isomers and cancer. *J. Nutr.* 137, 2599–2607.
16. KEPLER, C. R., S. B. TOVE (1967): Biohydrogenation of Unsaturated Fatty Acids: III. Purification and properties of a linoleate Δ^{12} -cis, Δ^{11} -trans-isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.* 242, 5686-5692.
17. 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.

18. 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.
19. MAŠEK, T., L. KRSTULOVIĆ, D. BROZIĆ, M. VRANIĆ, M. MAURIĆ, M. BAJIĆ, K. STARČEVIĆ (2014): Cow colostrum and early milk enriched with eicosapentaenoic and docosahexaenoic fatty acid. *Eur. Food Res. Technol.* 238, 635–640.
20. 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.
21. MAURIĆ, M. (2015): Utjecaj polimorfizma gena DGAT1, FASN, PRL, BRCA1 i TRL1 na mliječnost i zdravlje mliječne žlijezde krava. Doktorski rad. Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu. Zagreb, Republika Hrvatska.
22. 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.
23. 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.
24. MURPHY, E. F., C. JEWELL, G. J. HOOVELD, M. MULLER, K. D. CASHMAN (2006): Conjugated linoleic acid enhances transepithelial calcium transport in human intestinallike Caco-2 cells: an insight into molecular changes. *Prost. Leukotr. Essent. Fatty Acids.* 74, 295–301.
25. 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.
26. PARK, Y., M. W. PARIZA (2007): Mechanisms of body fat modulation by conjugated linoleic acid (CLA). *Food Res. Int.* 40, 311–323.
27. PARK, Y., M. W. PARIZA, Y. PARK (2008): Co-supplementation of dietary calcium and conjugated linoleic Acid (CLA) improves bone mass in mice. *J. Food Sci.* 73, C556–C560.

28. 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.
29. 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.
30. SEGALL, J. J. (1977): Is milk a coronary health hazard? *Br. Prev. Soc. Med.* 31, 81–85.
31. TANIGUCHI, M., T. UTSUGI, K. OYAMA, H. MANNEN, M. KOBAYASHI, Y. TANABE, A. OGINO, S. TSUJI (2004): Genotype of stearyl-CoA desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle. *Mam. Gen.* 14, 142-148.
32. 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.
33. YEH, F. C., R. YANG, T. J. BOYLE, Z. YE (2000): PopGene32, Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis, version 1.32. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada.
34. 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.
35. 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.

10. Sažetak

ANTONELA ČUIĆ

UTJECAJ POLIMORFIZMA GENA FASN NA KONCENTRACIJU KONJUGIRANE LINOLNE KISELINE U MLIJEKU

Istraživanje je provedeno kako bi se utvrdila povezanost polimorfizama gena FASN i količine konjugirane linolne kiseline u mlijeku kod holštajn-frizijske pasmine goveda.

Iz ispitivanog uzorka mlijeka izolirana je DNK i utvrđeni su pojedini genotipovi FASN gena za dva SNP 5848bpA/G i 5863bpT/C pomoću RFLP-PCR metode. Iz mlijeka je nakon toga izdvojena mliječna mast te je pomoću plinske kromatografije s masenom detekcijom određen masnokiselinski sastav pomoću eksternog standarda i koncentracija konjugirane masne kiseline pomoću specifične fragmentacije. 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 mogućnost 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 CLA mlijeku.

Ključne riječi: konjugirana linolna masna kiselina, holštajn-frizijska pasmina krava, polimorfizam, sintaza masnih kiselina

11. Summary

ANTONELA ČUIĆ

INFLUENCE OF FASN GENE POLYMORPHISM ON THE CONCENTRATION OF CONJUGATED LINOLEIC ACID IN MILK

The study was conducted to determine the association of FASN gene polymorphisms and the concentration of conjugated linoleic acid in milk of Holstein-Friesian cows.

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. 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. 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 CLA.

Keywords: conjugated linoleic fatty acid, Holstein-Friesian cows, polymorphism, fatty acid synthase