THE IGF2 AND NAMPT GENE POLYMORPHISMS AND ASSOCIATIONS WITH PERFORMANCE TRAITS IN CZECH LARGE WHITE PIG BREED

Chalupová P., Weisz F., Knoll A., Urban, T.

Department of Animal Morphology, Physiology and Genetics, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry Brno, Zemedelska 1, 613 00, Brno, Czech Republic

E-mail: xchalup1@mendelu.cz

ABSTRACT

Performance traits are crucial for pork production efficiency. Paternally expressed insulin-like growth factor 2 (IGF2) has influence to development and growth. Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT/PBEL/visfatin) gene plays an important role in lipid metabolism. The aim of this work was to test chosen polymorphisms in these genes in current Czech Large White pig population and analyze their influence to various performance traits. In total 98 sows were tested by PCR-RFLP for NciI polymorphism in IGF2 gene and for HpaII polymorphism in NAMPT gene. Allele frequencies were 0.82/0.18 (C/G) and 0.51/0.49 (C/T) in IGF2 and NAMPT respectively. CG genotype (IGF2), was associated with higher reproduction parameters breeding value ($P \leq 0.05$), when compared to CC. No significant differences were found betwen NAMPT genotypes. In analysis of gene association a interaction was CC/CC (NAMPT/IGF2) associated with higher backfat thickness ($P \leq 0.01$) when compared to CT/CC. Genotype CC/CC was associated with lower lean meat content ($P \leq 0.05$) when compared to CT/CC. Genotype TT/CC was associated with higher average daily gain breeding value when compared to CT/CC ($P \leq 0.01$), CT/CG and TT/CG ($P \leq 0.05$). Genotype CC/CG was associated with higher reproduction parameters breeding value when compared to TT/CC ($P \leq 0.01$) and CT/CC ($P \leq 0.05$). Moreover, genotype CT/CG was associated with higher reproduction parameters breeding value when compared to TT/CC ($P \leq 0.05$). Results should be verified in other populations.

Key words: pig, performance traits, *IGF2*, *NAMPT*, polymorphism, association

Acknowledgments: This study was supported by the IGA No. 16/2009

ÚVOD

V dnešních obtížných finančních podmínkách chovu prasat je pro konkurenceschopnost chovu nezbytná vysoká efektivita. Parametry užitkovosti a reprodukce jsou klíčovými faktory efektivní produkce. Včasná a přesná selekce pomocí genetických markerů může pomoci chovatelům obstát v tržním prostředí.

Gen *IGF2* (insulin-like growth factor 2) ovlivňuje růst a vývoj v embryonálním i postnatálním období. Má podíl na regulaci proliferace a diferenciaci myoblastů. *IGF2* vykazuje paternální expresi (Dvořák *et* Vrtková, 2001). Nachází se na p raménku SSC2 (*ArkDB*, 2007).

Inzulinu podobné růstové faktory I a II (insulin like growth factors I/II), rovněž známé jako somatomedin C a somatomedin A, patří do rodiny polypeptidových růstových faktorů. Funkce zahrnuje zprostředkování působení růstového hormonu, stimulaci růstu buněčných kultur, stimulaci působení inzulinu, ovlivňuje vývoj a růst. Patrně jsou autokrinními regulátory proliferace buněk (*Insulin-like growth factor II*, 2009).

Dříve popsaný polymorfizmus G3072A v intronu 3 genu *IGF2* je příčinnou mutací pro paternálně exprimovaný QTL na p raménku SSC2 se značným vlivem na růst svalů a výšku hřbetního tuku. Pro tento polymorfizmus neexistuje restrikční endonukleáza. Polymorfizmus G162C v intronu 7 genu *IGF2*, který lze detekovat restrikční endonuklázou *Nci*I je s příčinným polymorfizmem ve vazbové nerovnováze (Vykoukalová *et al*., 2006).

NAMPT (nicotinamide phosphoribosyltransferase, visfatin) gen kóduje faktor (enzym) ovlivňující biosyntézu NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) u savců. Dále uváděný také jako *PBEL* (pre-B cell colony-enhancing factor 1). (Nowacka-Woszuk *et al*., 2008; Wang *et al*., 2007).

Protein je adipokin, který se nachází v krvi a má různé funkce včetně podpory zrání hladkých svalových buněk v cévách a inhibice apoptózy neutrofilů. Také aktivuje inzulinový receptor a má inzulinomimetický efekt, snižuje glykémii a zlepšuje senzitivitu tkání na inzulin. Protein je vysoce exprimován ve viscerálním tuku, sérové hladiny proteinu korelují s obezitou (*GeneCards*, 2009).

U prasat byl gen *NAMPT* zmapován na SSC9q23 (Nowacka-Woszuk *et al*., 2008).

U člověka byla zjištěna pozitivní korelace hladiny visfatinu v krevní plasmě s hladinou HDL-cholesterolu a negativní korelace s triglyceridy. Data naznačují negativní korelaci mezi hladinou visfatinu, útrobním tukem a inzulinovou rezistencí (Wang *et al*., 2007).

V intronu 9 genu *NAMPT* byl nalezen polymorfizmus T669C, mající vliv na složení jatečného těla a kvalitu masa (Čepica *et al*., 2008).

Cílem práce je analyzovat vybrané polymorfizmy obou genů na aktuálním souboru prasat plemene české bílé ušlechtilé a zhodnotit asociaci s parametry užitkovosti.

MATERIÁL A METODIKA

Bylo testováno 98 prasnic plemene české bílé ušlechtilé. U daného souboru byly stanoveny polymorfizmy: G162C v intronu 7 genu *IGF2* a T669C intronu 9 genu *NAMPT*. DNA byla izolována z periferní krve pomocí JETQUICK® Blood & Cell culture DNA Spin Kit (GENOMED) v souladu s protokolem výrobce.

*Stanovení polymorfizmu Nci***I** *v genu IGF2 (PCR-RFLP)*

Upraveno dle metodiky Vykoukalová *et al*., (2006).

PCR byla provedena v termálním cykleru GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems).

Primery: F: 5´- CACAGCAGGTGCTCCATCGG - 3´

R: 5´- GACAGGCTGTCATCCTGTGGG - 3´

Složení reakční směsi

Celkový objem 25 µl

2 µl templátové DNA, 18,8 µl H_2O, 2,5 µl LA PCR buffer complete (Top-Bio), 0,5 µl 10 mM dNTP mixu (Fermentas), 0,5 µl primeru F (10 pmol/µl), 0,5 µl primeru R (10 pmol/µl), 0,2 µl LA DNA polymerázy (5 U/µl) (Top-Bio).

Teplotní profil PCR reakce

Úvodní denaturace 95 °C/2 min

34 cyklů (denaturace 95 °C/20 s, annealing 64 °C/30 s, elongace 68 °C/60 s)

závěrečná elongace 68 °C/7 min.

PCR produkt byl následně štěpen přes noc restrikční endonukleázou *Nci*I (*Bcn*I) při 37 °C. Fragmenty byly elektroforeticky separovány na 3 % agarózovém gelu (TBE pufr). Vizualiace pomocí ethidium bromidu za použití UV světla.

*Stanovení polymorfizmu Hpa***II** *v genu NAMPT (PCR-RFLP)*

Dle metodiky Zrůstová *et al*., (2009).

PCR byla provedena v termálním cykleru GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems).

Primery: F: 5´- GGGTCATAACTTGACTTTGGAGAA - 3´

R: 5´- TCTAGAGAACCTGAAGAGAGCAGAA - 3´

Složení reakční směsi
Celkový objem 25 µl

2 µl templátové DNA, 18,8 µl H_2O, 2,5 µl LA PCR buffer complete (Top-Bio), 0,5 µl 10 mM dNTP mixu (Fermentas), 0,5 µl primeru F (10 pmol/µl), 0,5 µl primeru R (10 pmol/µl), 0,2 µl LA DNA polymerázy (5 U/µl) (Top-Bio).

Teplotní profil PCR reakce

Úvodní denaturace 95 °C/2 min

30 cyklů (denaturace 95 °C/20 s, annealing 54 °C/30 s, elongace 68 °C/50 s)

závěrečná elongace 68 °C/7 min.

PCR produkt byl následně štěpen přes noc restrikční endonukleázou *Hpa*II (*Msp*I) při 37 °C. Fragmenty byly elektroforeticky separovány na 3 % agarózovém gelu (TBE pufr). Vizualiace pomocí ethidium bromidu za použití UV světla.

Statistická analýza

Analýza byla provedena v programu SAS v 9.1.4 pomocí procedury GLM:

$$Y_{ijklm} = \mu + IGF2_i + \mathrm{NAMPT_j} + \mathrm{int}_k + MxR_nar_l + e_{ijklm}$$

Yi_{jklm} – *fenotypová hodnota analyzovaného znaku*
μ – *průměr populace*
$IGF2_i$ – *pevný efekt genotypu IGF2*
$NAMPT_j$ – *pevný efekt genotypu NAMPT*
int_k – *efekt interakce obou genu*
MxR_nar_l – *efekt měsíce a roku narození*
e_{ijklm} – *náhodná chyba pozorování*

VÝSLEDKY A DISKUZE

*Stanovení polymorfizmu Nci***I** *v genu IGF2*

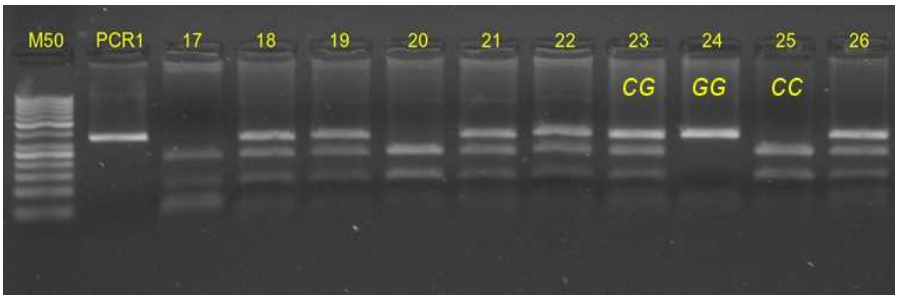
PCR produkt (336 bp) tvoří po štěpení restrikční endonukleázou *Nci*I dle genotypu fragmenty následujících velikostí:

GG – 308 a 28 bp

CG – 308, 208, 100 a 28 bp

CC – 208, 100 a 28 bp

*Obr. 1 Stanovení genotypů – polymorfizmus Nci*I *v genu IGF2.*



*Stanovení polymorfizmu Hpa*II *v genu NAMPT*

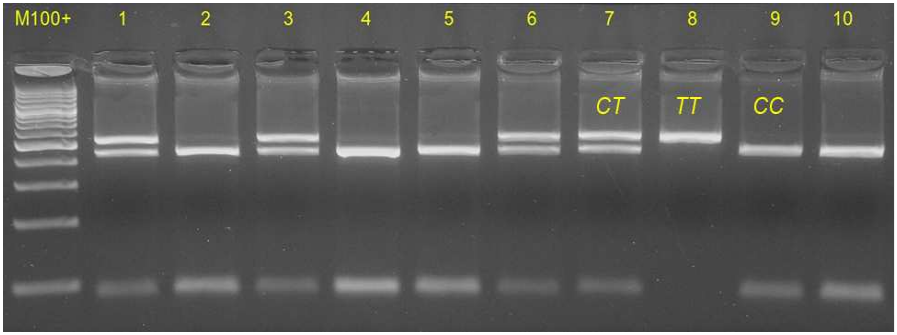
PCR produkt (524 bp) tvoří po štěpení restrikční endonukleázou *Hpa*II dle genotypu fragmenty následujících velikostí:

TT – 524 bp (neobsahuje štěpné místo)

CT – 524, 432 a 92 bp

CC – 432 a 92 bp

*Obr. 2 Stanovení genotypů – polymorfizmus Hpa*II *v genu NAMPT.*



Výpočet frekvence genotypů a alel

Tab. 1 Frekvence genotypů.

	IGF2			***NAMPT***		
genotyp	*GG*	*CG*	*CC*	*TT*	*CT*	*CC*
četnost absolutní	1	34	63	23	50	25
četnost relativní	0,0102	0,3469	0,6429	0,2347	0,5102	0,2551

Tab. 2 Frekvence alel.

	IGF2		***NAMPT***	
alela	*C*	*G*	*C*	*T*
četnost absolutní	160	36	100	96
četnost relativní	0,8163	0,1837	0,5102	0,4898

Knoll *et al*., (2000) udává u plemene české bílé ušlechtilé relativní četnost alely *C* (resp.*B*) 0,83 (n = 21) genu *IGF2*. U téhož plemene uvádí Vykoukalová *et al*., (2006) relativní četnost alely *C* 0,80 (n = 20), Verner (2007) zjistil hodnotu 0,86 (n = 174).

Relativní četnost 0,51 alely *C* genu *NAMPT* udává i Zrůstová *et al*., (2009). Hodnoty korespondují s námi analyzovanými údaji (viz tab 1 a 2).

Asociační analýza

Pouze jeden jedinec vykazoval pro polymorfismus *Nci*I v genu *IGF2* genotyp *GG*. Z důvodu možného zkreslení dat byl tento vzorek (genotyp) z asociační analýzy vyloučen. Proto bylo do asociační analýzy zahrnuto pouze 97 prasat plemene české bílé ušlechtilé. Bylo by vhodné, vzhledem k nerovnoměrnému rozložení genotypů, zkoumaný soubor rozšířit.

*Tab. 3 Asociace polymorfizmu Nci*I *v genu IGF2 (LSM ± S_E).*

IGF2	***CC* (63)**	***CG* (34)**	***GG* (1)**
výška hřbetního tuku	0,65 ± 0,02	0,67 ± 0,02	–
% libového masa	63,63 ± 0,18	63,7 ± 0,24	–
Ø přírůstek od narození	611,9 ± 8,9	609,77 ± 11,72	–
Ø přírůstek v testu	1000,86 ± 19,73	973,5 ± 26,11	–
plemenná hodnota přírůstku	26,61 ± 1,88[a]	20,94 ± 2,49[a]	–
plemenná hodnota % libov.masa	1,35 ± 0,06	1,25 ± 0,08	–
plemenná hodnota reprod. ukaz.	1,30 ± 0,06*	1,51 ± 0,08*	–
celková plemenná hodnota	1200,43 ± 32,29	1238,81 ± 42,74	–

Hodnoty se stejnými exponenty v řádku vykazují následující statisticky významné rozdíly:
**P ≤ 0,01, * P ≤ 0,05, [a] blížící se průkaznosti, LSM – průměrný nejmenší čtverec, S_E – střední chyba průměru.

V polymorfizmu *Nci*I v genu *IGF2* (viz tab.3) vykazovali jedinci genotypu *CC* vyšší plemennou hodnotu přírůstku (blížící se průkaznosti) v porovnání s genotypem *CG*. Genotyp *CG* byl oproti genotypu *CC* asociován s vyšší plemennou hodnotou reprodukčních ukazatelů (P ≤ 0,05).

Verner (2007) uvádí vysoce průkazný rozdíl (P ≤ 0,01) mezi genotypy *GG* a *CG* (resp. *AA* a *AB*) ve výšce hřbetního tuku měřené ke středu druhého hrudního obratle a průkazný rozdíl (P ≤ 0,05) mezi genotypy *GG* a *CC* (resp. *AA* a *BB*) u výšky hřbetního tuku měřené ke středu posledního hrudního obratle.

*Tab. 4 Asociace polymorfizmu Hpa*II *v genu NAMPT (LSM ± S_E).*

NAMPT	***CC* (25)**	***CT* (50)**	***TT* (23)**
výška hřbetního tuku	0,69 ± 0,02	0,65 ± 0,02	0,63 ± 0,03
% libového masa	63,37 ± 0,26[a]	63,58 ± 0,17	64,04 ± 0,28[a]
Ø přírůstek od narození	600,24 ± 12,51	610,29 ± 8,23	621,90 ± 13,51
Ø přírůstek v testu	968,07 ± 27,88	980,84 ± 18,32	1012,63 ± 30,10
plemenná hodnota přírůstku	21,95 ± 2,66	21,83 ± 1,75[a]	27,54 ± 2,87[a]
plemenná hodnota % libov.masa	1,27 ± 0,09	1,27 ± 0,06	1,37 ± 0,09
plemenná hodnota reprod. ukaz.	1,52 ± 0,08[a]	1,43 ± 0,05	1,28 ± 0,09[a]
celková plemenná hodnota	1255,20 ± 45,63	1202,53 ± 29,99	1201,13 ± 49,26

Hodnoty se stejnými exponenty v řádku vykazují následující statisticky významné rozdíly:
**P ≤ 0,01, * P ≤ 0,05, [a] blížící se průkaznosti, LSM – průměrný nejmenší čtverec, S_E – střední chyba průměru.

V polymorfizmu *Hpa*II v genu *NAMPT* (viz tab. 4) vykazovali jedinci genotypu *TT* v porovnání s *CC* vyšší procentuální zastoupení libového masa (blížící se průkaznosti). Zrůstová *et al*., (2009) však uvádí vyšší % libového masa u jedinců genotypu *CC* oproti *TT* (P ≤ 0,05) a *CT* (neprůkazný rozdíl). Genotyp *CT* je asociován s vyšší plemennou hodnotou přírůstku oproti genotypu

TT (blížící se průkaznosti). Genotyp *CC* je asociován s vyšší plemennou hodnotou reprodukčních ukazatelů oproti genotypu *TT* (blížící se průkaznosti). Čepica *et al*., (2008) uvádí asociaci genotypu *TT* s vyšším hřbetním tukem u plemene Large White (n = 216, P ≤ 0,05). V námi zkoumaném souboru nebyla asociace polymorfizmu *Hpa*II v genu *NAMPT* s výškou hřbetního tuku zjištěna.

*Tab. 5 Asociace a interakce polymorfizmu Hpa*II *v genu NAMPT a Nci*I *v genu IGF2 (LSM ± S_E).*

NAMPT / IGF2	***CC / CC* (17)**	***CC / CG* (8)**	***CT / CC* (32)**	***CT / CG* (17)**	***TT / CC* (14)**	***TT / CG* (9)**
výška hřbetního tuku	0,71 ± 0,03**$^{/a}$	0,67 ± 0,04	0,61 ± 0,02**	0,69 ± 0,03	0,63 ± 0,03^{a}	0,63 ± 0,04
% libového masa	63,07± 0,32$^{a/b/*}$	63,67± 0,40	63,89 ± 0,22*	63,28 ± 0,32	63,93 ± 0,35^{a}	64,15 ± 0,44^{b}
Ø přírůstek od narození	594,38 ± 15,66^{a}	606,10 ± 19,27	606,80 ± 10,42	613,78 ± 15,48	634,38 ± 16,89^{a}	609,42 ± 21,40
Ø přírůstek v testu	964,53 ± 34,90^{a}	971,61 ± 42,92	985,00 ± 23,22	976,67 ± 34,48	1053,04 ± 37,63^{a}	972,22 ± 47,67
plemenná hodnota přírůstku	24,02 ± 3,33^{a}	19,89 ± 4,09*^{1}	22,24 ± 2,22**	21,43 ± 3,29*^{2}	33,58 ± 3,59$^{a/*1/*2/*3/**}$	21,51 ± 4,55*^{3}
plemenná hodnota % libov.masa	1,31 ± 0,11	1,22 ± 0,13	1,34 ± 0,07	1,19 ± 0,11	1,41 ± 0,12	1,33 ± 0,15
plemenná hodnota reprod. ukaz.	1,39 ± 0,10	1,65 ± 0,13*$^{1/}$**	1,36 ± 0,07*^{1}	1,50 ± 0,10^{*2}	1,16 ± 0,11$^{*2/}$**	1,40 ± 0,14
celková plemenná hodnota	1211,44 ± 57,11	1298,97± 70 ,25^{a}	1170,14 ± 38,01^{a}	1234,92 ± 56,44	1219,73 ± 61,58	1182,54 ± 78,01

Hodnoty se stejnými exponenty v řádku vykazují následující statisticky významné rozdíly:
**P ≤ 0,01, * P ≤ 0,05, ^{a} blížící se průkaznosti, LSM – průměrný nejmenší čtverec, S_E – střední chyba průměru

V analýze asociace a interakce obou polymorfizmů (viz tab. 5) byl zjištěn vyšší hřbetní tuk u kombinace genotypů *CC*/*CC* (*NAMPT/IGF2*) oproti *CT*/*CC* (P ≤ 0,01) a *TT*/*CC* (blížící se průkaznosti). Kombinace *CC*/*CC* vykazuje nižší % libového masa oproti *CT*/*CC* (P ≤ 0,05), *TT*/*CC* a *TT*/*CG* (blížící se průkaznosti). Genotyp *TT*//*CC* je asociován s vyšším průměrným přírůstkem od narození v porovnání s *CC*/*CC* (blížící se průkaznosti). Průměrný přírůstek v testu byl vyšší u genotypu *TT*/*CC* oproti *CC*/*CC* (blížící se průkaznosti). Plemenná hodnota přírůstku byla vyšší u *TT*/*CC* v porovnání s *CT*/*CC* (P ≤ 0,01), s *CC*/*CG*, *CT*/*CG* a *TT*/*CG* (P ≤ 0,05) a s *CC*/*CC* (blížící se průkaznosti). Plemenná hodnota reprodukčních ukazatelů byla vyšší u *CC*/*CG* oproti *TT*/*CC* (P ≤ 0,01) a *CT*/*CC* (P ≤ 0,05); hodnota byla také vyšší u *CT*/*CG* v porovnání s *TT*/*CC* (P ≤ 0,05). Celková plemenná hodnota byla vyšší u *CC*/*CG* v porovnání s *CT*/*CC* (blížící se průkaznosti). K porovnání asociace a interakce nebyla nalezena literatura.

ZÁVĚR

U souboru 98 prasnic plemene české bílé ušlechtilé byly testovány metodou PCR-RFLP dva polymorfizmy: *Nci*I v genu *IGF2* a *Hpa*II v genu *NAMPT*. Genotyp *GG* byl ve zkoumaném souboru zastoupen pouze u jednoho vzorku, proto byl tento z asociační analýzy vyloučen. U genu *IGF2* byly zjištěny průkazné rozdíly ($P \leq 0,05$) u plemenné hodnoty reprodukčních ukazatelů. U dalších námi zkoumaných parametrů nebyl nalezen statisticky významný rozdíl. Rovněž u genu *NAMPT* nebyl nalezen statisticky významný rozdíl. Avšak v analýze asociace a interakce obou polymorfizmů byly zjištěny vysoce průkazné rozdíly ($P \leq 0,01$) u výšky hřbetního tuku; vysoce průkazné ($P \leq 0,01$) a průkazné ($P \leq 0,05$) u plemenné hodnoty přírůstku a plemenné hodnoty reprodukčních ukazatelů. Průkazné rozdíly ($P \leq 0,05$) byly zjištěny u % libového masa. Za účelem vyrovnanějšího zastoupení genotypů by bylo vhodné zkoumaný soubor rozšířit a ověřit výsledky na dalších populacích. Výzkum stále pokračuje.

LITERATURA

ArkDB, [online]. Roslin Bioinformatics Group, 2007, © 2007 Roslin Institute. [cit. 2009-10-5]. Dostupné z:<http://www.thearkdb.org/arkdb/do/getMappingDetails?accession=ARKCGM00000002>.

Čepica S., Bartenschlager H., Óvilo C., Fernandez A., Zrůstová J., Masopust M., Knoll A. Geldermann H., SNP within the porcine NAMPT/PBEF1/visfatin is associated with fat and carcass traits. In XXXI Conference of the International Society for Animal Genetics, 2008, July 20-24, Amsterdam, The Netherlands. Poster 2039.

Dvořák, J., Vrtková, I. Malá genetika prasat II. *MZLU v Brně*, 2001. 91p.

GeneCards [online]. 2009 [cit. 2009-10-8]. Dostupné z: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NAMPT>.

Insulin-like growth factor II [online]. Online Mendelian Inheritance in Man, 2009, © 1966-2009 Johns Hopkins University. [cit. 2009-10-5]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=147470>.

Knoll, A., Putnová, L., Dvořák J., Čepica S. A NciI PCR-RFLP within intron 2 of porcine insulin-like growth factor 2 (IGF2) gene. *Animal Genetics*, 2000, Vol. 31, p. 150–151.

Nowacka-Woszuk, J. Szczerbal, I. Fijak-Nowak, H., Switonski, M. Chromosomal localization of 13 candidate genes for human obesity in the pig genome. *J. Appl. Genet.*, 2008. Vol. 49, No. 4, p. 373–377.

Verner, J. Analýza genů MYOD rodiny, IGF2 a myostatinu v produkci kvalitního vepřového masa [s.l.]. MZLU v Brně, 2007. 96s. Disertační práce.

Vykoukalová, Z., Knoll, A., Dvořák, J., Čepica, S. New SNPs in the IGF2 gene and association between this gene and backfat thickness and lean meat content in Large White pigs. J.*Anim. Breed. Genet.*, 2006, Vol. 123, p. 204–207.

Wang, P., van Greevenbroek, M.M.J., Bouwman, F.G., Brouwers, M.C.G.J., van der Kallen, C.J.H., Smit, E., Keijer, J., Mariman, E.C.M. The circulating PBEF/NAMPT/visfatin level is associated with a beneficial blood lipid profile. Eur. J. Physiol, 2007, Vol. 454, p. 971–976.

Zrůstová, J., Knoll, A., Urban, T., Čepica, S. The visfatin (NAMPT; PBEF1) gene polymorphisms and associations with meat performance traits in three pig breeds kept in the Czech Republic, 2009 In press.