

THE EVALUATION OF THE MELANOCORTIN-4 RECEPTOR OF THE RIANODINE-1 RECEPTOR AND THE INTERACTION BETWEEN THIS GENES ON CARCASS TRAIT IN PIGS

Dvořáková V., Stupka R., Šprysl M., Čítek J., Kluzáková E., Okrouhlá M., Kratochvílová H.

Czech University of Life Science Prague, Czech Republic

Abstract

The melanocortin-4 receptor (MC4R) plays an important role in the control of mammalian energy homeostasis. In this context, many researches noted that a variant of the candidate gene MC4R may explain the significant variation in backfat thickness, growth rate, and feed intake in commercial pig hybrids. The aim of this study was demonstrated the effect mutation AF087937:c.746G>A in the MC4R gene, the effect causal mutation C1843T in the RYR1 gene and the interaction between these genes. In this study was found the significant influence of allele *G* in the MC4R gene and of allele *n* in the RYR1 gene on lean meat. Moreover, we did not find the interaction between these on killing out percentage. Also we assume, that allele *G* have influence on higher lean meat. In the contrary, we did not find an evidential influence of c.746G>A in the MC4R gene on fatness. We detected the significant influence only on backfat thickness and we did not find any trend of MC4R gene on fatness. Also we assume, that this effect influenced of the RYR1 gene.

Key Words: MC4R, RYR1, carcass traits, pig

Využívání genetických markerů pro potřeby šlechtitelů se jeví jako slibný nástroj pro zlepšení užitkových vlastností prasat prostřednictvím MAS (markery assisted selection) u řady užitkových znaků. Výhodou těchto markerů je jejich širší aplikace (bez rozdílů věku či pohlaví) při relativně nízkých nákladech. Naopak nevýhodou je míra efektu dané mutace, jež může být snadno překryta genovým pozadím či přístup k matematicko-statistickému vyhodnocení u divergentních populací. Předpokladem úspěšnosti těchto metod je determinace lokusů pro kvantitativní znaky, které mají „velký“ efekt na užitkovou vlastnost, mohou vysvětlovat poměrně velkou část genetické proměnlivosti (Lande 1990) a podléhají dědičnosti dle Mendela. Mezi geny příčinné (geny velkého účinku) patří gen IGF-II, PRKAG3 či RYR1. Tyto geny výrazně ovlivňují jak kvantitativní tak kvalitativní vlastnosti jatečně upraveného těla. Navíc efekt genu RYR1 je běžně zahrnován do modelů asociačních studií mezi polymorfizmem kandidátních genů a užitkovými znaky. Asociační analýzu mezi příčinou mutací genu RYR1 a užitkovými znaky u prasat publikovala řada autorů (Krzącio et al., 2007a, b; Otto et al., 2007). U jedinců jež jsou nositeli alely *n* Fiedler et al. (1999) našli větší průměr svalových vláken, větší glycolitický potenciál, nižší pH a větší odkap. Navíc řada autorů uvádí vliv alely *n* na vyšší procento svaloviny a lely *N* na vyšší ukládání tuku (Fisher et al., 2000 a,b; Pedersen et al., 2001; Wittmann et al., 1993 atd.). Další významnou skupinu tvoří geny kandidátní jako je například melanocortin -4 receptor (MC4R). Tento gen se nachází v oblasti mezi markery SW2035 a SW962 pro obsah tuku (Bruun et al., 2006), což podporuje teorii, že substituční mutace Asp298Asn genu MC4R by mohla být mutace příčinná. Navíc Kim et al. (2004a) vytvořili funkční analýzu proteinu genu MC4R

a našli odlišnosti v produkci cAMP mezi variantami Asp298 a 298Asn. Prasečí MC4R byl mapován na chromosomu 1q22-q27 (Kim et al. 2000a). Asociace substituční mutace AF087937:c.746G>A (Asp298Asn) na růstový potenciál a tučnění byly popsány v řadě prací s odlišným genetickým pozadím u prasat (Kim et al., 2000b, Houston et al., 2004, Van den Maagdenberg et al. 2007, Fan et al. 2009). Nicméně některé studie uvádí, že nebyl nalezen průkazný vliv této substituční mutace ani na růstový potenciál ani na ukládání tuku (Park et al, 2002, Stachowiak et al., 2005).

Cílem této studie bylo otestovat vliv substituční mutace Asp298Asn genu MC4R při zahrnutí vlivu genu RYR1 a vyhledání případných interakcí mezi těmito geny na užitkové vlastnosti prasat chovaných v ČR.

Materiál a metodika

Zvířata

Předkládaná studie byla založena na otestování fenotypových hodnot u 531 prasat. Do testování bylo zahrnuto 8 hybridních kombinací a jedno čisté plemeno [(ČBuxČL)x(PnxBo), (ČBuxČL)xPIC, (ČBuxČL)xPn, ČBuxČL, PICxFH, (ČBuxČL)x(BoxD), (ČBuxČL)x(HxPn), (ČBuxČL)x(BoxPn) a ČBU). Prasata byla naskladněna o hmotnosti 25-30 kg a poražena při dosažení průměrné porážkové hmotnosti cca 108 kg. Byly použity tři strategie krmení: *ad libitum*, dávkovaně a kombinace *ad libitum* a dávkovaného krmení. Živinové složení 1 kg kompletní krmné směsi (KKS) bylo na počátku výkrmu LYZ: 12,2 g/kg, ME: 12,9 MJ/kg a na konci výkrmu LYZ: 8,7 g/kg, ME: 12,9 MJ/kg. U restringovaných skupin byl příjem krmiva od 90 kg živé hmotnosti omezen na maximální denní příjem 37,4 MJ ME.

Užitkové znaky

Průměrný denní přírůstek v testu byl vypočítán jako podíl mezi živou hmotností dosaženou od zahájení do ukončení testu a dny od zahájení testu do porážkového dne. Procento svaloviny a hloubka svalu v *Musculus longissimu lubmorum et thoracis* (MLLT) byla měřena pomocí metody Fat-O-Meter (FOM) a pomocí dvoubodové metody (ZP) v oblasti *glutis medius* (GS). Disekce jatečně upraveného těla probíhala dle Walstra a Merkuse (1995) a boku dle Stupka et al. (2004). Obsah intramuskulárního tuku a obsah tuku v boku 1, 2 a 3 byl stanoven dle normy ISO 1443.

Genotypování

U všech testovaných prasat byl stanoven genotyp u mutace c. 746G>A genu MC4R dle Kim et al. (2000b) u příčinné mutace C1843T genu RYR1 dle Breniga a Brema (1992).

Asociační analýza

Effekt substituční mutace c.746G>A genu MC4R na sledované znaky byl analyzován s použitím procedury UNIVARIATE, MEANS, GLM (typIV). Tento model zahrnoval MC4R a RYR1 genotyp, kombinaci křížence, pohlaví a výživu. Tyto efekty tvořily fixní faktory, jako kovarianta byla použita hmotnost JUT. Přičemž byl použit následující model:

$$Y_{ijkl} = \mu + a_i + b_j + c_k + d_l + e_m + \beta x_n + e_{ijklm}$$

Y_{ijkl} = znak jatečné hodnoty; μ = celkový průměr; a_i = vliv genotypu genu MC4R ($i = 1, 2, 3$); b_j = vliv genotypu genu RYR1 ($j = 1, 2$); c_k = vliv křížence ($k = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$); d_l = vliv pohlaví ($l = 1, 2$); e_m = vliv výživy ($m = 1, 2, 3$); β = regresní koeficient na hmotnost JUT ; x_n = vliv hmotnosti JUT; e_{ijklm} = náhodná chyba.

Průkazné rozdíly mezi skupinami byly testovány analýzou variance pomocí Sheffeho testu. Všechna data byla analyzována pomocí statisticko matematického programu SAS (9.1 institute, 2001).

Výsledky a diskuze

Zastoupení genotypu u mutace Asp298Asn (c.746G>A) genu MC4R bylo : AA= 107, AG= 253, GG=171. Výsledky této studie potvrdily vliv alely Asp298 (alely G) na procento svaloviny měřené metodou ZP (Tab. 1). Dále je z této tabulky zřejmé, že na procento svaloviny měl vliv i gen RYR1. Avšak interakce mezi geny nalezena nebyla. Vliv genu RYR1 na procento svaloviny (pod vlivem alely n) publikovala řada autorů (Fisher et al., 2000 a,b; Pedersen et al., 2001). Navíc byl nalezen vliv křížence, pohlaví a výživy. Vliv křížence na procento svaloviny potvrdila řada studií. V této souvislosti Šimek et al. (2004) uvádí statisticky průkazný vliv hybridních kombinací na procento svaloviny ($p < 0,001$). Vliv pohlaví a křížence potvrdili i Latorre et al. (2003). Trend alely Asp298 na vyšší zmasilost byl zaznamenán i u hloubky svalu měřené metodou FOM a ZP (Tab. 1). Avšak nebyl nalezen vliv

genotypu genu MC4R na procento svaloviny (FOM). Nicméně opět byl potvrzen vliv genu RYR1, křížence a pohlaví.

V této studii nebyl potvrzen vliv mutace Asp298Asn genu MC4R na průměrné denní přírůstky. Obdobné závěry uvádí i Park et al. (2002) či Stachowiak et al. (2005). Přičemž Fan et al. (2009) uvádí, že varianta genu MC4R má vliv na růstový potenciál a tučnění, avšak efekt těchto variant je podmíněn působením dalších SNPs (singl nukleotid polymorphism). Dále autor uvádí, že pravděpodobně existuje interakce mezi substitučními mutacemi Arg236His a Asp298Asn genu MC4R. V této souvislosti Fan et al. (2009) uvádí, že p.Arg236His může mít dopad na vliv p.Asp298Asn. Tedy frekvence alel/genotypů může být příčinou nepotvrzení vlivu p.Asp298Asn genu MC4R na růstový potenciál u studií Park et al. (2002) či Stachowiak et al. (2005). Statisticky průkazný vliv této mutace na růstový potenciál a tučnění uvádí řada studií (Kim et al., 2004b; Houston et al., 2004; Óvilo et al., 2006). V této studii byl potvrzen statisticky průkazný vliv p.Asp298Asn pouze na výšku tuku v linii pŕlicího řezu nad posledním bederním obratlem (Tab. 2). Avšak u ostatních fenotypových hodnot nebyl nalezen statisticky průkazný vliv ani žádný trend, přesto že řada studií uvádí vliv alely A na výšku hřbetního tuku (Kim et al. 2000b; Hernández-Sánchez et al., 2003; Houston et al., 2004; Fan et al., 2009). Tyto výsledky doplňuje i studie QTL z níž je patrné, že gen MC4R se nachází na lokusu, jež je spojen se znaky pro ukládání tuku (Bruun et al., 2006) a funkční analýza proteinů mezi variantami Asp298 a 298Asn v níž byla detekována odlišná hladina produkce cAMP (Kim et al. 2004a). Avšak i přesto, že v naší studii byla vytvořena asociační analýza u 156ks jednoto křížence [(ČBuxČL)xPn] ani v tomto souboru nebyl potvrzen vliv na výšku tuku v linii pŕlicího řezu ani na obsah tuku v boku 1, 2 a 3 (data nejsou ukázána). Tento fakt si je možno vysvětlit působením genového pozadí a pro lepší pochopení vlivu této mutace autoři považují za podstatné otestovat populaci 531 kŕsu prasat i na p.Arg236His. Naopak jednoznačný vliv na obsah tuku byl potvrzen u genu RYR1 (Tab. 2). Tyto výsledky potvrzuje studie Wittmann et al. (1993). Je tedy možné, že nalezená interakce pro výšku tuku v linii pŕlicího řezu 3 u genu MC4R byla ovlivněna působením genu RYR1, což dokládá i nalezená statisticky průkazná interakce mezi oběma geny (Tab. 2). Dále byl nalezen vliv křížence u všech sledovaných fenotypových hodnot pro ukládání tuku a čteně vlivu na IMT se jako velmi významný jevil i vliv pohlaví (Tab. 2). Vliv genu MC4R v předkládané asociační studii na obsah IMT potvrzen nebyl. V případě, že v modelu nebyl zahrnut efekt genu RYR1 (tedy ani interakce mezi geny) byl nalezen statisticky průkazný vliv ($p < 0,006$) v celé populaci (531 ks). Statisticky průkazný vliv ($p < 0,0001$) byl nalezen i u stresrezistentní populace (441 ks) (data nejsou ukázána). Navíc Van den Maagdenberg et al. (2007) uvádí, že prokázali statisticky průkazný vliv ($p < 0,05$) na obsah IMT, tedy že prasata genotypu GG měla nižší obsah IMT ve srovnání s AA genotypem. Tyto závěry potvrzuje i naše studie, avšak jsou statisticky neprůkazné (Tab.2).

Tabulka 1. Asociční analýza mezi p-Asp298Asn genu MC4R na znaky pro ukládání tuku

Užitkové znaky	AA±S.D.	AG±S.D.	GG±S.D.	P value	R	R*M	G	P	V
Obsah tuku v boku 1 (%)	28,57±7,20	29,63±8,11	28,42±7,68	ns	**		**	**	
Obsah tuku v boku 2 (%)	33,21±6,86	34,62±7,18	33,39±7,96	ns	**		**	**	
Obsah tuku v boku 3 (%)	36,21±6,43	37,42±8,24	36,10±8,24	ns	**		**	**	
Obsah IMT v pečeni (%)	2,19±0,56	1,84±0,59	1,58±0,48	ns			*		
Obsah IMT v krkovicí (%)	4,39±2,04	4,17±1,57	3,84±1,62	ns			**		
Obsah IMT v plecích (%)	2,75±0,77	2,58±0,83	2,16±0,66	ns	*		**		
Výška tuku v linii pŕlicího řezu 1 (mm)	37,29±6,64	37,86±7,50	36,38±7,28	ns		*	**	**	**
Výška tuku v linii pŕlicího řezu 2 (mm)	20,04±4,74	21,09±5,55	20,43±5,24	ns			**	**	*
Výška tuku v linii pŕlicího řezu 3 (mm)	23,65±6,10 ^a	24,27±6,85 ^a	25,10±5,83 ^b	0,05		*	**	**	**
Průměrná výška tuku v linii pŕlicího řezu (mm)	26,99±4,89	27,74±5,65	27,35±5,20	ns		*	**	**	**

p<0,05 ^{a,b}, p<0,01 **, R (RYR1), R*M (interakce mezi genem RYR1 a genem MC4R), G (genotyp), P (pohlaví), V (výživa)

Tabulka 2. Asociční analýza mezi p-Asp298Asn genu MC4R a užitkovými znaky

Užitkové znaky	AA±S.D.	AG±S.D.	GG±S.D.	P value	R	R*M	G	P	V
Průměrný denní přírůstek (g/den)	905±100,60	906±107,61	891±98,28	ns			**	**	**
Procento svaloviny; ZP (%)	56,86±4,02 ^a	57,41±4,39 ^a	58,60±4,15 ^b	0,03	*		**	**	**
Hloubka svalů; ZP (mm)	74,29±9,59	75,76±8,82	77,68±8,29	ns	**		**	**	**
Hloubka tuku; ZP (mm)	16,17±5,21	15,94±5,77	14,67±5,35	ns			**	**	*
Procento svaloviny; FOM (%)	55,84±3,01	55,57±3,32	55,68±3,86	ns	*		**	**	
Hloubka svalů; FOM (mm)	60,07±7,86	60,53±8,03	63,99±7,82	ns	**		**	*	
Hloubka tuku; FOM (mm)	16,73±4,15	16,92±4,15	17,33±4,84	ns	*		**	**	

p<0,05 ^{a,b}, p<0,01 **, R (RYR1), R*M (interakce mezi genem RYR1 a genem MC4R), G (genotyp), P (pohlaví), V (výživa)

Závěr

Z předkládané studie je patrný vliv alely *G* genu MC4R na vyšší procento svaloviny, jež byl statisticky potvrzen. Naopak nebyl nalezen jednoznačný trend tohoto genu pro ukládání tuku ani vliv na růstový potenciál, tento fakt mohl být způsoben působením genového pozadí a považujeme tedy za nutné pokračovat v testování u dalšího SNP (Arg236His genu MC4R). Byl nalezen vliv genu RYR1 na obsah tuku v boku 1, 2 a 3 a mezi geny byla nalezena interakce pro výšku tuku v linii pŕlicího řezu. Dále byl nalezen vliv křížence u všech sledovaných užitkových znaků. Vliv plemene byl potvrzen u všech znaků čteně IMT. V této studii byl potvrzen i vliv výživy a to na výšku tuku v linii pŕlicího řezu, průměrný denní přírůstek, procento svaloviny a hloubku tuku/svalu měřenou metodou ZP.

Seznam literatury

- Brenig B., Brem G. (1992). Molecular-cloning and analysis of the porcine halothane gene. *Animal Breeding*. 35, 129-135.
- Bruun C.S., Jørgensen C.B., Nielsen V.H., Andersson L., Fredholm M. (2006). Evaluation of the porcine melanocortin 4 receptor (MC4R) gene as a positional candidate for a fitness QTL in a cross between Landrace and Hampshire. *Animal Genetics*. 27, 359–62.
- Fan B., Onteru K. S., Plastow S. G., Rothschild F. M. (2009). Detailed characterization of the porcine MC4R gene in relation to fatness and growth. *Animal Genetics*, 40, 401-409.
- Fiedler, I., K. Ender, M. Wicke, S. Maak, G. V. Lengerken and W. Meyer. (1999). Structural and functional characteristics of muscle fibres in pigs with different malignant hyperthermia susceptibility (MHS) and different meat quality. *Meat Sci*. 53, 9-15.
- Fisher P, Mellett FD and Hoffman LC (2000a). Halothane genotype and pork quality. 1. Carcass and meat quality traits from the three halothane genotypes. *Meat Science*. 54,97-105.
- Fisher P, Mellett FD and Hoffman LC (2000b). Halothane genotype and pork quality. 2. Cured meat products from the free halothane genotypes. *Meat Science*. 54, 107-111.
- Hernández-Sánchez J., Visscher P., Plastow G., Haley C. (2003). Candidate gene analysis for quantitative traits using the transmission disequilibrium test: the example of the melanocortin-4 receptor in pigs. *Genetics*. 164, 637–44.
- Houston R.D., Cameron N.D., Rance K.A. (2004). A melanocortin-4 receptor (MC4R) polymorphism is associated with performance traits in divergently selected Large White pig populations. *Animal Genetics*. 35, 386–90.
- Kim K.S., Larsen N.J., Rothschild M.F. (2000a). Linkage and physical mapping of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene. *Journal of Animal Science*. 78, 791–2.
- Kim K.S., Larsen N.J., Short T., Plastow G., Rothschild M.F.(2000b). A missense variant of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth, and feed intake traits. *Mammalian Genome*. 11, 131–5.
- Kim K.S., Reecy J.M., Hsu W.H., Andersson L.L., Rothschild M.F.(2004a): Function and phylogenetic analysis of a melanocortin-4 receptor mutation in domestic pigs. *Domestic Animal Endocrinology*. 26, 75–86.
- Kim K.S., Thomsen H., Bastiaansen J., Nguyen N.T., Dekkers J.C.M.,Plastow G.S., Rothshild M.F. (2004b). Investigation of obesity candidate genes on porcine fat deposition quantitative trait loci regions. *Obesity Research*. 12, 1981–94.
- Krzęcio, E., Koćwin-Podsiadła, M., Kurył, J., Zybert, A., Sieczkowska, H., Antosik, K. (2007a). The effect of genotypes at loci CAST/MspI (calpastatin) and MYOG (myogenin) and their interaction on selected productive traits of porkers free of gene RYR1^T. I. Muscling and morphological composition of carcass. *Animal Science Papers and Reports*. 25, 5–16.
- Krzęcio, E., Koćwin-Podsiadła, M., Kurył, J., Zybert, A., Sieczkowska, H., Antosik, K. (2007b). The effect of genotypes at loci CAST/MspI (calpastatin) and MYOG (myogenin) and their interaction on selected productive traits of porkers free of gene RYR1^T. II. Meat quality. *Animal Science Papers and Reports*. 25, 17–24.
- Lande R, Thompson R (1990). Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics*. 124,743–756.
- Latorre M.A., Lazaro R., Gracia M.I., Nieto, M., Mateos, G.G. (2003). Effect of sex and terminal sire genotype on performance, carcass characteristics, and meat quality of pigs slaughtered at 117 kg body weight. *Meat Sci*. 65, 1369-1377.
- Otto, G., R. Roehle, H. Looft, L. Thoelking, P. W. Knap, M. F. Rothschild, G. S. Plastow, and E. Kalm. (2007). Associations of DNA markers with meat quality traits in pigs with emphasis on drip loss. *Meat Sci*. 75,185–195.
- Óvilo C., Fernández A., Rodríguez M.C., Nieto M., Silió L. (2006). Association of MC4R gene variants with growth, carcass composition and meat and fat quality traits in heavy pigs. *Meat Sci*. 73, 42–7.
- Park H.B., Carlborg O., Marklund S., Andersson L. (2002). Melanocortin-4 receptor (MC4R) genotypes have no effect on fatness in a Large White Wild Boar intercross. *Animal Genetics*. 33,155–7.
- Pedersen, P. H., Oksbjerg, N., Karlsson, A. H., Busk, H., Bendixen, E., Henckel, P. (2001). A within litter comparison of muscle fibre characteristics and growth of halothane carrier and halothane free crossbreed pigs. *Livestock Production Science*. 73, 15–24.
- SAS[®] Propriety Software Release 9.01 of the SAS[®] system for Microsoft[®] Windows[®]. SAS Institute Inc., Cary, NC., 2001.
- Stupka R., Sprysl M., Pour M. (2004). Analysis of the formation of the belly in relation to sex. *Czech Journal of Animal Science*. 49, 2, 64-70.

- Šimek J., Grolichová M., Steinhauserová I., Steinhauser L. (2004). Carcass and meat quality of selected final hybrids of pigs in the Czech Republic. *Meat Sci.* 66 . 383-386.
- Stachowiak M., Szydłowski M., Obarzanek-Fojt M., Switonski M. (2005). An effect of a missense mutation in the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene on population traits in Polish pigbreeds is doubtful. *Animal Genetics.* 37, 55–7.
- Van den Maagdenberg K., Stinckens A., Claeys E., Seynaeve M., Clinquart A., Georges M., Buys N., De Smet S. (2007). The p.Asp298Asn missense mutation in the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene can be used to affect growth and carcass traits without an effect on meat quality. *Animal.* 1, 1089–98.
- Walstra P., Merkus G.S.M. (1995). Procedure for assessment of the lean meat percentage as consequence of the new EU reference dissection method in pig carcass classification. DLO-Res.Inst. for Animal Science and Health, Res. Branch, Zeist, Netherlands. 1-22.
- Wittmann W.; Peschke W.; Littmann E.; Behringer J.; Birkenmaier S.; Dövc P.; Förster M. (1993). Mast- und Schlachtleistungen von DL-Kastraten in Abhängigkeit vom MHS-Genotyp. *Zuchtungskunde Stuttgart.* 65, 3, 197-205.

Tento příspěvek byl vypracován za přispění výzkumného záměru MSM 6046070901