

## THE EFFECT OF POLYMORPHISM SER638ARG/PVUII IN THE CALPASTATIN (CAST) GENE AND THE EFFECT OF CAUSE MUTATION IN RYRI GENE ON THE QUALITATIVE TRAITS OF MEAT IN THE CZECH REPUBLIC

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

*Czech University of Life Sciences Prague, Czech Republic*

### Abstract

This study was concerned of the polymorphism Ser638Arg/PvuII in the *calpastatin* (*CAST*) and of the *RYRI* genes on selected qualitative traits. The investigation included 179 hybrids and one pure animal [(PNxLWs)x(LxLWD), (DxLWs)x(LxLWD), LW, Lx LWD, Pnsx(LxLWD)]. The frequency of the genotypes at the *CAST*/Ser638Arg/PvuII loci was: A/A 45, A/C 103, C/C 34. The frequency of genotype of the causal mutation *RYRI* was: 170 N/N and 12 N/n. Statistic differences between the Ser638/Arg/PvuII polymorphism of *CAST* gene on qualitative characteristics of pork meat on the electric conductivity of MLLT ( $p < 0.001$ ) and on the pH ( $p < 0.0005$ ) were detected. A significant differences were found between causal mutation of the *RYRI* gene on pH ( $p < 0.006$ ), the electric conductivity in the MLLT ( $p < 0.0001$ ) and the electric conductivity in the ham ( $p < 0.008$ ). A interactions between Ser638Arg/PvuII polymorphism of the *CAST* gene and causal mutations of the *RYRI* gene and the electric conductivity of MLLT ( $p < 0.001$ ) as well as pH ( $p < 0.005$ ) were demonstrated.

V posledních desetiletí byl zaznamenán podstatný pokrok u řady ekonomicky důležitých znaků jak u rostlin tak u hospodářských zvířat a to propojením molekulární genetiky a umělé selekce či introgrese (Dekkers and Hospital 2002). Vysokého genetického zisku bylo dosaženo i přes skutečnost, že většina těchto znaků jsou kvantitativní znaky, jež jsou pod kontrolou polygenů a faktorů vnějšího prostředí. Tedy i přes to, že pozorovatelná fenotypová hodnota (plemenná hodnota jedince) je odrazem složitého komplexu řady faktorů a genů. Principem molekulárních metod je identifikace polymorfních míst (SNP<sub>s</sub>), a ty jsou následně využívána ve šlechtitelských programech (MAS markery asistovaná selekce). Tímto místem může být příčinná mutace nebo takový genetický marker, jež je v genové nerovnováze s QTL (Georges 2007). Mezi polymorfizmi je následně provedena biometrická analýza v rámci níž je možno určit genotypovou hodnotu jedince. Na tomto principu byly identifikovány příčinné mutace genů *RYRI*, *IGF-II* či *PRKAG3* a řada kandidátních genů. Fujii et al. (1991) našel SNP u genu *RYRI*, jež bylo spojeno s maligní hypertermií u prasat. U jedinců jež byli nositeli alely *n*, Fiedler et al. (1999) našli větší diameter svalových vláken, zvýšený glykolitický potenciál, nižší pH a vyšší odkap vody.

Jedním z mnoha kandidátních genů je calpastatin (*CAST*), který patří v současné době mezi exkluzivně studované geny. Tento gen významně ovlivňuje calpain-calpastatin proteolitický systém, hraje důležitou roli v normálním růstu svalů během postnatální periody (Goll et al., 1998), degradaci svalových bílkovin (Kristensen et al., 2002), enzymatické aktivitě calpain enzymů (Koomaraie et al., 2006) a fúzi myoblastů (Kwak et al., 1993). Gen *CAST* byl lokalizován na chromosomu 2 (Ernst et al., 1998) a Ciobanu et al. (2004) u tohoto genu publikovali asociační analýzu substituční mutace p.Ser638Arg na znaky masa u prasat (textura, odkap vody).

Cílem této studie bylo otestovat vliv substituční mutace p.Ser638Arg genu *CAST* při zahrnutí vlivu genu *RYRI* a vyhledání případných interakcí mezi těmito geny na užitkové vlastnosti prasat chovaných v ČR.

### Materiál a metodika

#### Zvířata

Předkládaná studie testovala fenotypové hodnoty u 179 prasat. Tato populace zahrnovala čtyři kombinace kříženců [(ČLxČBu)x(PNxČBu), (ČLxČBu)x(DxČBu), ČLxČBu, (ČLxČBu)xPn] a jedno čisté plemeno české bílé ušlechtilé. Prasata byla naskladněna o hmotnosti 25-30kg a poražena při dosažení průměrné porážkové hmotnosti 113 kg (S.D. ±10,5). Prasata byla krmena čtyř komponentní krmnou směsí (pšenice, ječmen, sojový extrahovaný šrot, premix doplňků esenciálních prvků) ad libitum nebo dávkovaně.

#### Užitkové vlastnosti

Disekce jatečně upraveného trupu (JUT) probíhala dle Walstra a Merkuse (1995). Byly měřeny následující ukazatele: pH 45 min. *post mortem* v *musculus longissimus lumborum et thoracis* (MLLT), elektrická vodivost a teplota 45 min. *post mortem* v MLLT a kýtě, odkap masa z MLLT, textura u MLLT a barva masa v MLLT pomocí spektrofotometru Minolta. Obsah intramuskulárního tuku v pečení, kýtě a pleci dle normy ISO 1443.

#### Asociační analýza

U všech testovaných zvířat byl stanoven genotyp pro p.Ser638Arg genu *CAST* dle Ciobanu et al. (2004) a pro příčinou mutaci g.1843C>T genu *RYRI* dle Breniga a Brema (1992).

### Asociační analýza

Byla vytvořena sociační analýza mezi p.Ser638Arg genu *CAST* a příčinnou mutací g.1843C>T genu *RYRI* a kvalitativními znaky pomocí programu SAS (SAS 9.1; SAS Inst. Inc., Cary, NC) s použitím procedury GLM (Typ IV). Model zahrnoval *CAST/RYRI* genotyp, kombinaci křížence, pohlaví a výživu. Tyto efekty tvořily fixní faktory, jako kovarianta byla použita hmotnost JUT. Přičemž byl použit následující model:

$$Y_{ijklmn} = \mu + a_i + b_j + (a_i|b_j) + c_k + d_l + e_m + \beta X_n + f_{ijklmn}$$

$Y_{ijklmn}$  = hodnota znaku;  $\mu$  = celkový průměr;  $a_i$  = vliv genotypu *CAST* ( $i = 1, 2, 3$ );  $b_j$  = vliv genotypu *RYRI* ( $j = 1, 2$ );  $a_i|b_j$  = interakce mezi genem *CAST* a *RYRI*;  $c_k$  = efekt kombinace křížence; ( $k = 1, 2, 3, 4, 5$ );  $d_l$  = efekt pohlaví ( $l = 1, 2$ );  $e_m$  = efekt výživy ( $m = 1, 2$ );  $\beta$  = regresní koeficient na hmotnost JUT;  $X_n$  = hmotnost zvířete  $n$ ;  $f_{ijklmn}$  = náhodná chyba.

### Výsledky a diskuze

Byly získány fragmenty očekávané délky genu *RYRI* (143 bp) a genu *CAST* (183 bp) (obrázek 1).

Frekvence genotypů genu *CAST* byla *A/A* 45, *A/C* 103, *C/C* 34 a genu *RYRI*: 170 *N/N* and 12 *N/n*. Ačkoli Kristensen et al. (2002) uvádí, že gen *CAST* hraje důležitou roli v degradaci svalových bílkovin a Koomaraie et al. (2006) potvrdili vliv tohoto genu na m-calpain a m-caplain v předkládané studii nebyl prokázán vliv substituční mutace p.Ser638Arg genu *CAST* na ztrátu vody odkapem. Přesto, že statisticky průkazný vliv na ztrátu vody odkapem našli autoři Ciobanu et al. (2004). Navíc Ciobanu et al. (2004) našli vliv této mutace na texturu, avšak ani u tohoto ukazatele v předkládané studii nebyl nalezen statisticky průkazný vliv, jak dokládá tabulka 1. Z tabulky 1 je patrné, že jedinci s nejnižším pH, tedy genotypem *A/A* měli zároveň i nejnižší odkap, nebyl tedy prokázán žádný trend. Naopak byl nalezen vliv genu *CAST* na pH 45 min. *post mortem* v MLLT. Navíc mezi geny byla nalezena statisticky průkazná interakce (Tabulka 1).

Korelaci mezi těmito geny dokládá graf 1, z něhož je patrné, že prasata s genotypem *A/A* a *N/N* měli nejvyšší hodnoty pH, kdežto prasata s genotypem *C/C* a *N/n* měli hodnoty pH nejnižší.

Tyto výsledky korespondují s prací Fiedler et al. (1999), autoři uvádí je jedinci jež jsou nositeli alely *n* mají nižší pH či práce Fujii et al. (1991), jež našli vztah mezi genem *RYRI* a náchylností prasat k projevu maligní hypertermie, tedy k projevu vady masa PSE (bledé, měkké, vodnaté). V předkládané studii byl potvrzen vliv genu *CAST* na elektrickou vodivost v MLLT a mezi geny byla nalezena interakce. Přesto že u elektrické vodivosti v kýtě nebyl potvrzen statisticky průkazný vliv ani nebyla nalezena interakce mezi výše zmíněnými geny trend byl zachován. Tedy nejvyšší hodnoty byly u obou měření zjištěny u genotypu *A/A* a nejnižší u genotypu *C/C* (Tabulka 1). Naopak v této práci nebyl potvrzen vliv na teplotu masa 50 min. *post mortem*, barvu masa ani obsah intramuskulárního tuku v MLLT, pleci a kýtě (Tabulka 1, některá data nejsou ukázána).

### Závěr

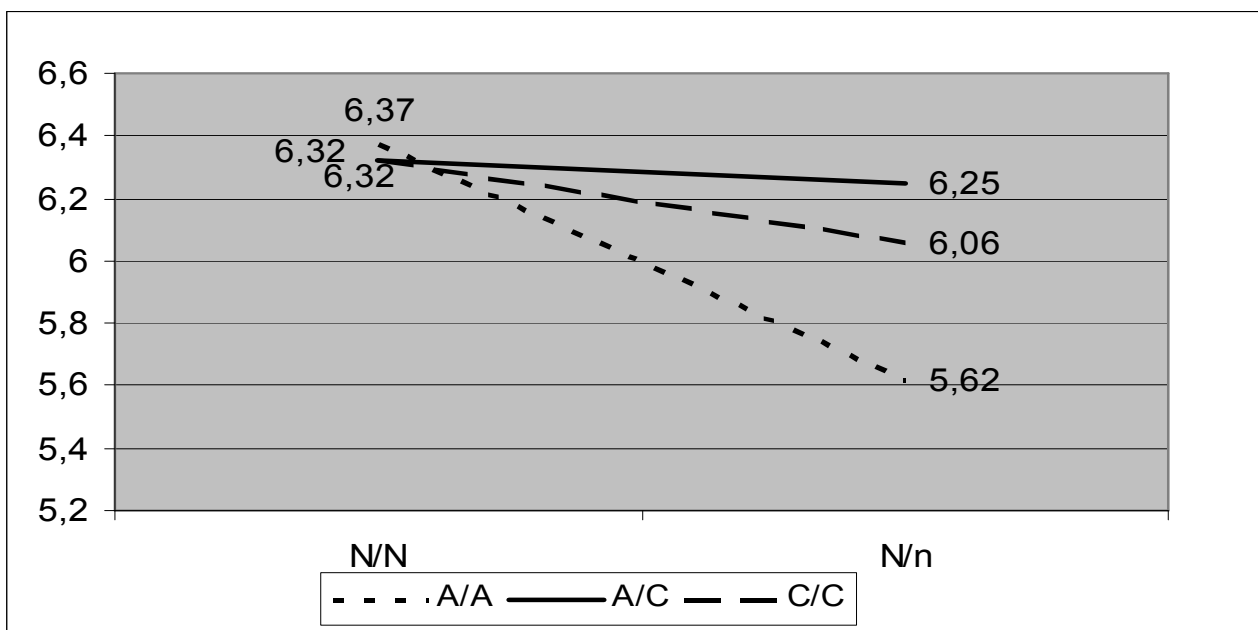
Z předkládané studie je patrný vliv substituční mutace p.Ser638Arg genu *CAST* na pH 45 min. *post mortem*. Avšak přesto, že nejnižší hodnoty byly naměřeny u genotypu *A/A* genu *CAST*, ze studie vyplynulo, že mezi touto mutací a příčinou mutací genu *RYRI* existují statisticky průkazné interakce a jako nevhodnější se jeví kombinace s genotypem *A/A* a *N/N*. Navíc u p.Ser638Arg byl nalezen statisticky průkazný vliv na elektrickou vodivost v MLLT a mezi geny byla rovněž potvrzena statisticky průkazná interakce. Naopak u p.Ser638Arg nebyl nalezen vliv na texturu, teplotu, odkap, barvu masa ani na obsah intramuskulárního tuku. Vzhledem k faktu, že byl nalezen vliv mutace p.Ser638Arg na hodnoty pH, jež byly v interakci s jedním z neznámějších příčinných genů, který je navíc spojen s projevem vady PSE (bledé, měkké, vodnaté) a tato mutace se nachází v exonu, kde mění aminokyselinu, jsme toho názoru, že je třeba ve studii tohoto SNP pokračovat a rozšířit ji o studium exprese tohoto genu.

**Tabulka 1. Asociační analýza mezi substituční mutací p.Ser638Arg genu *CAST* a znaky kvality masa**

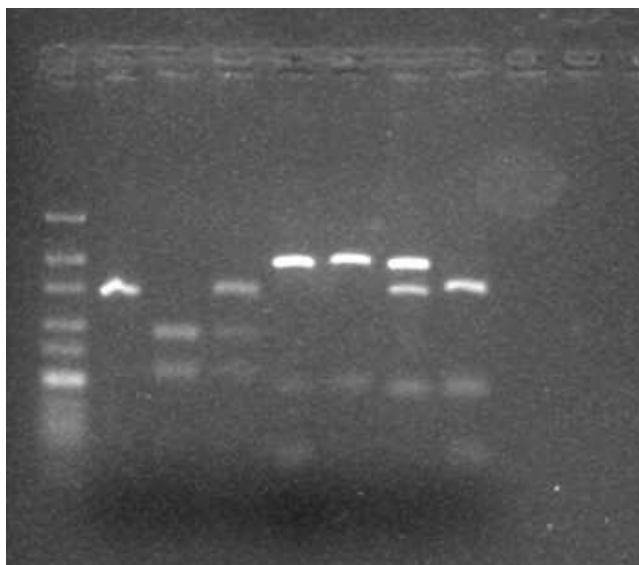
	<i>A/A</i> ±S.D.	<i>A/C</i> ±S.D.	<i>C/C</i> ±S.D.	P value	C*R
E v MLLT (mS)	4,33±1,19 <sup>Aa</sup>	3,67±0,72 <sup>Bb</sup>	3,84±1,36 <sup>b</sup>	0.001	0.001
E v kýtě (mS)	3,96±0,77	3,53±0,69	3,39±0,73	NS	NS
pH45	6,29±0,33	6,31±0,26	6,32±0,31	0.0005	0.005
Teplota (° C)	38,74±1,85	38,23±1,46	37,60±1,11	NS	NS
Odkap vody (%)	13,12±3,22	12,11±2,41	14,74±7,94	NS	NS

S.D. – směrodatná odchylka; NS – statisticky neprůkazné; <sup>A,B</sup> -  $P < 0,001$ , <sup>a,b</sup> -  $P < 0,05$ ; C\*R interakce mezi genem *RYRI* a genem *CAST*; E – elektrická vodivost

**Graf 1. Interakce mezi genem *CAST* a genem *RYR1* na hodnoty pH**



**Obrázek 1**



DNA Ladder 50 bp: PCR produkt genu *RYR1* (*N* alela 134 bp, *n* alela 86+48 bp); *N/N* genotyp genu *RYR1*; *N/n* genotyp genu *RYR1*; PCR produkt genu *CAST* (allele *A* 183 bp, allele *C* 142+41 bp); *A/A* genotyp genu *CAST*; *A/C* genotyp genu *CAST*; *C/C* genotyp genu *CAST*; ( z leva do prava)

**Seznam literatury**

- Brenig B, Brem G, 1992. Molecular-cloning and analysis of the porcine halothane gene. *Arch Tierz. Dummerstorf* 35: 129-135.
- Ciobanu DC, Bastiaansen JWM, Lonergan SM, Thomsen H, Dekkers JCM, Plastow GS, Rothschild MF, 2004. New alleles in calpastatin gene are associated with meat quality traits in pigs. *Journal of Animal Science* 82: 2829–2839.
- Dekkers JCM, Hospital F, 2002. The use of molecular genetics in improvement of agricultural populations. *Nature Reviews Genetics* 3: 22–32.
- Ernst CW, Robic A, Yerle M, Wang L, Rothschild MF, 1998. Mapping of calpastatin and three microsatellites to porcine chromosome 2q2.1–q2.4. *Animal Genetics* 29: 212–215.
- Georges M, 2007. Mapping, fine mapping, and molecular dissection of quantitative trait loci in domestic animals. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet* 8:131-162.
- Fiedler I, Ender K, Wicke M, Maak S, Lengerken VG, Meyer W, 1999. Structural and functional characteristics of muscle fibres in pigs with different malignant hyperthermia susceptibility (MHS) and different meat quality. *Meat Sciences* 53: 9-15.
- Fujii J, Otsu K, Zorzato F, De Leon S, Khanna VK, Weiler JE, et al. 1991. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* 253: 448–451.
- Goll DE, Thompson VF, Taylor RG, Ouali A, 1998. The calpain system and skeletal muscle growth. *Canadian Journal of Animal Science* 78: 503–512.
- Koohmaraie M, Geesink GH, 2006. Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat Science* 74: 34–43.
- Kristensen L, Therkildsen M, Riis B, Sørensen MT, Oksbjerg N, Purslow PP, Ertbjerg E, 2002. Dietary-induced changes of muscle growth rate in pigs: Effects on in vivo and postmortem muscle proteolysis and meat quality. *Journal of Animal Science* 80: 2862-2871.
- SAS<sup>®</sup> Proprietary Software Release 9.01 of the SAS<sup>®</sup> system for Microsoft<sup>®</sup> Windows<sup>®</sup>. SAS Institute Inc., Cary, NC., 2001.
- Kwak KB, Chung SS, Kim OM, Kang MS, Ha DB, Chung CH, 1993. Increase in the level of m-calpain correlates with the elevated cleavage of filamin during myogenic differentiation of embryonic muscle cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1175: 243-249.
- Walstra P, Merkus GSM, 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.

The study was supported by Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (Project No. MSM 6046070901)