

## THE EFFECT OF MISSENSE MUTATION G.143C>T IN THE *CTSL* GENE ON PRODUCTION TRAITS WITHOUT THE EFFECT ON QUALITY OF PORK MEAT

*Dvořáková V., Stupka R., Šprysl M., Čítek J., Okrouhlá M., Kluzáková E., Brzobohatý L.*

*Czech University of Life Sciences Prague, Czech Republic*

*dvorakovav@af.czu.cz*

### Abstract

The aim of this study was to test the influence of the missense mutation AJ315771:g.143C>T in the *CTSL* gene on selected production traits in pig crosses. These crosses are commonly used in commercial farms in the Czech Republic. The allele frequencies of g.143C>T were 0.04 for allele *T* and 0.96 for allele *C*. We detected statistically significant differences on the feed consumption, the backfat thickness, the lean meat and on the area of the *MLLT*. Allele *T* correlated with higher values of fatness and feed consumption and allele *C* with a greater percentage of lean meat. However, in this study we did not find any significant influence on qualitative traits of meat.

**Keywords:** cathepsin, pig, quantitative traits, PCR-RFLP

Cathepsin L patří do cathepsin rodiny (*CTSL*, *CTSB*, *CTSD*, *CTSH*, *CTSF* a *CTSZ*), což je skupina genů, jež produkuje lysosomální proteinázy důležité pro degradaci bílkovin. Jejich role spočívá především v proteolýze masa *post mortem*. Tyto geny mohou být tedy zodpovědné za kvalitativní vlastnosti masa (Toldrá a Flores 1998). Avšak tuto teorii netvrdila zatím žádná publikovaná studie (Russo et al. 2002, 2008; Fontanesi et al. 2010). Naopak Fontanesi et al. (2010) uvádějí, že geny rodiny cathepsin hrají důležitou roli u kvantitativních produkčních znaků prasat. Autoři uvádějí, že našli statisticky průkazný vliv genu *CTSL* na průměrný denní přírůstek, procento svaloviny a výšku tuku v linii pŕlicího řezu, ( $P < 0,05$ ). Tyto výsledky korespondují se zjištěním, že gen *CTSL* byl lokalizován v oblasti QTL pro průměrný denní přírůstek a výšku tuku v linii pŕlicího řezu (Fontanesi et al. 2001, 2010; Knott et al. 1998; Rohrer et al. 2006). Navíc Fontanesi et al. (2010) provedli RH mapování u genu *CTSS* a lokalizovali tento gen na prasečím chromozomu 4 v oblasti QTL pro ukládání tuku a procento svaloviny. Tyto nálezy doplňují funkční studie, jež detekovali vliv této rodiny genů na imunitní odpověď, aktivaci a regulaci biochemických drah hormonů a proenzymů, buněčnou smrt prostřednictvím apoptózy, proliferaci nádorů či tvorbu metastáz (Barros et al. 2004; Brix et al. 2001; Dunn et al. 1991; Funkelstein et al. 2008; Hook et al. 2009; Mohamed a Sloane 2006; Stoka et al. 2007; Yang et al. 2007; Zavasnik-Bergant a Turk 2006). Tyto výsledky a výsledky nedávných studií tedy nabízí novou teorii, a to že geny cathepsin a jejich lysosomální proteinázy mají ještě jinou důležitou buněčnou funkci, než je degradace proteinů.

Cílem této studie bylo potvrdit vliv substituční mutace AJ315771:g.143C>T genu *CTSL* na vybrané kvalitativní a kvantitativní produkční znaky vepřového masa.

### Materiál a metodika

#### Zvířata

Předkládaná studie byla založena na otestování řady znaků výkrmnosti a jatečné hodnoty u 514 prasat (Tab. 1). Zvířata byla chována po dobu testu v Testační stanici Ploskov ČZU Katedry speciální zootechniky. Prasata byla naskladněna o hmotnosti 25-30 kg a poražena při dosažení průměrné porážkové hmotnosti 108 kg. Prasata byla krmena čtyř komponentní krmnou směsí (pšenice, ječmen, sójový extrahovaný šrot, premix doplňků esenciálních prvků) *ad libitum* a/nebo dávkovaně.

#### Užitkové vlastnosti

Disekce jatečně upraveného trupu (JUT) probíhala dle Walstra a Merkuse (1995). Disekce boku probíhala podle metodiky popsané v práci Stupka et al. (2004). Byly měřeny následující fenotypové hodnoty: průměrný denní přírůstek v testu (u 503 prasat), živá hmotnost při porážce (u 446 prasat), jatečná výtěžnost (u 383 prasat), konverze krmiva (u 443 prasat), výška tuku (u 507 prasat), hloubka svalů (u 505 prasat) a procento svaloviny (u 506 prasat) měřené metodou ZP (dvoubodová metoda), výška tuku (u 247 prasat) nad *musculus longissimus lumborum et thoracis* (*MLLT*) a plocha *MLLT* (u 258 prasat) měřená pomocí programu NIS-Elements Ar 2.30.

#### Genotypování

U všech testovaných prasat byl stanoven genotyp u mutace AJ315771:g.143C>T genu *CTSL* (Fontanesi et al. 2010).

#### Asociační analýza

Asociační analýza pro znaky výkrmnosti a jatečné hodnoty byla tvořena odlišným počtem prasat (fenotypové hodnoty v jednotlivých skupinách byly měřeny u náhodně

části populace, nebo nebyly měřeny vůbec; některé hodnoty byly odstraněny jako odlehlé chyby či odlehlá pozorování). Efekt mutace g.143C>T genu *CTSL* byl analyzován s použitím procedury UNIVARIATE, MEANS, GLM (typ IV) pomocí programu SAS (9.1 Institute). Tento model zahrnoval *CSTL* genotyp (jedinci s genotypem *TT* byly z důvodu nízké četnosti vyřazeny; 3 prasata), kombinaci křížence, pohlaví a výživu jako fixní faktor. Hmotnost JUT byla použita jako regresní koeficient. Byl použit následující model:

$$Y_{ijklm} = \mu + a_i + b_j + c_k + d_l + \beta X_m + e_{ijklm}$$

$Y_{ijklm}$  = znak jatečné hodnoty;

$\mu$  = celkový průměr;

$a_i$  = vliv genotypu genu *CTSL* ( $i = 1, 2$ );

$b_j$  = vliv kombinace křížence ( $j = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$ );

$c_k$  = vliv pohlaví ( $k = 1, 2$ );

$d_l$  = vliv výživy ( $l = 1, 2$ );

$\beta X_m$  = vliv hmotnosti JUT zvířete  $m$ ;

$e_{ijklm}$  = náhodná chyba.

**Tabulka 1. Přehled hybridních kombinací využitých pro asociační studii**

Skupina	Kombinace křížence	Počet prasat
1	(BUxL)x(PnxBO), (BUxL)xPIC	71 (35+36)
2	(BUxL)xPn	46
3	BU, BUxL, (BUxL)xPn	68 (23+21+24)
4	PICxFH	62
5	(BUxL)x(BOxD)	71
6	(BUxL)x(HxPn)	70
7	(BUxL)x(Pn)	65
8	(BUxL)x(BOxPn)	61

BU - bílé ušlechtilé; L – landrasa; H - hampshire; FH - francouzský hybrid; Pn – pietrain; PIC - Pig Improvement Company;

## Výsledky a diskuze

V předkládané studii u mutace g.143C>T genu *CTSL* byla nalezena frekvence alely *T* 0,04 a frekvence alely *C* 0,96 (četnost genotypů byla: *TT*=3, *TC*=36 a *CC*=446). Z důvodu nízké četnosti genotypu *TT* byla tato prasata vyřazena z asociační analýzy.

V rámci asociační studie byl nalezen statisticky průkazný vliv této mutace na procento svaloviny ve prospěch genotypu *CC*. Naopak větší ukládání tuku bylo nalezeno u prasat, jež byla nositeli alely *T* (Tab. 2). Tyto výsledky korespondují se závěry Fontanesi et al. (2010). Autoři ve své práci uvádí, že byl nalezen vliv této mutace na výšku tuku v linii plicního řezu a na průměrný denní přírůstek. Ačkoli v rámci tohoto projektu nebyl prokázán statisticky průkazný vliv na růstový potenciál, trend této mutace na průměrný denní přírůstek byl nalezen,  $P < 0,07$  (Tab. 2). Navíc v rámci této studie bylo zjištěno, že prasata, jež jsou nositeli alely *T* mají statisticky průkazně horší konverzi krmiva (Tab. 2). Dále v rámci genotypování bylo zjištěno, že u prasat jež měla v otcovské pozici v hybridizačním programu plemeno pietrain (plemeno prasat s nadprůměrným osvalením), byly nalezeny pouze genotypy s alelou *C*. Nízkou frekvencí alely *T* u nadprůměrně ovalených plemen, uvádějí i Fontanesi et al. (2010). Tento fakt a výše zmíněné výsledky jsou pravděpodobně příčinou vyššího selekčního tlaku ve prospěch alely *C*. Tato teorie koresponduje i se zjištěním, že u prasat jež byla nositeli pouze alely *C*, byl nalezen větší podíl hlavních masitých

částí bez tukového krytí (data nejsou ukázána, statisticky neprůkazné) a nižší obsah tuku v boku 1, 2 a 3 (Tab. 2). Dále byl zjištěn statisticky průkazný vliv na výšku tuku nad *MLLT* a plochu *MLLT* ve prospěch genotypu *CC* (Tab. 2).

V předkládané studii nebyl zjištěn vliv této mutace na kvalitativní znaky vepřového masa jako je pH, teplota, odkap, elektrická vodivost v kýtě a kotletě (data nejsou ukázána). Tyto výsledky jsou v souladu s publikovanými pracemi v rámci genů rodiny cathepsins (Russo et al. 2002, 2008; Fontanesi et al. 2010). Přestože tato rodina genů cathepsin produkuje lysosomální proteínázy důležité pro degradaci bílkovin, jejichž role spočívá v proteolýze masa *post mortem*, v současné době neexistuje publikovaná práce, jež by našla statisticky průkazný vliv těchto genů na kvalitativní ukazatele vepřového masa. Výsledky této studie a výsledky dříve publikovaných prací tedy nabízí novou teorii, a to že tato skupina genů má ještě jinou důležitou buněčnou funkci, než je degradace proteinů. Tuto teorii podporují funkční studie těchto genů jež uvádí, že rodina cathepsin má vliv na řadu signálních drah hormonů a proenzymů, apoptózu či růst nádorů (Barros et al. 2004; Brix et al. 2001; Dunn et al. 1991; Funkelstein et al. 2008; Hook et al. 2009; Mohamed a Sloane 2006; Stoka et al. 2007; Yang et al. 2007; Zavasnik-Bergant a Turk 2006). Teoretický vliv genu *CTSL* na produkční znaky, podporují i studie, jež v oblasti genu *CTSL* našli QTL interval pro ukládání tuku a růstový potenciál prasat (Fontanesi et al. 2001, 2010; Knott et al. 1998; Rohrer et al. 2006).

**Tabulka 2. Asociační analýza mezi substituční mutací AJ315771:g.143C>T genu CTSL na vybrané kvalitativní vlastnosti vepřového masa a na vybrané kvantitativní produkční znaky prasat**

Užitkový znak	CT (LSM) ± SE	CC (LSM) ± SE	P hodnota
Průměrný denní přírůstek- PDP (g)	875 ± 7,79	889 ± 4,69	0,07
Živá hmotnost (kg)	111,72 ± 0,36	112,35 ± 0,20	0,06
Jatečná výtěžnost (%)	81,74 ± 0,27	81,31 ± 0,15	0,07
Konverze krmiv (1kg KKS/1 PDP)	2,97 ± 0,04	2,89 ± 0,02	<b>0,03</b>
Výška tuku měřená metodou ZP (mm)	16,05 ± 0,67 <sup>a</sup>	14,77 ± 0,40 <sup>b</sup>	<b>0,03</b>
Hloubka svalu MGM metodou ZP (mm)	76,33 ± 0,95	76,94 ± 0,57	0,46
Procento svaloviny metodou ZP (%)	57,42 ± 0,49	58,37 ± 0,29	<b>0,03</b>
Výška tuku nad MLLT (mm)	17,21 ± 0,89	15,25 ± 0,55	<b>0,01</b>
Plocha MLLT (mm <sup>2</sup> )	4464 ± 107,10	4691 ± 61,82	<b>0,02</b>
Obsah tuku v boku 1 (%)	31,03 ± 1,42	28,80 ± 0,85	0,08
Obsah tuku v boku 2 (%)	33,69 ± 1,43	32,53 ± 0,85	0,37
Obsah tuku v boku 3 (%)	36,14 ± 1,52	34,90 ± 0,93	0,36

<sup>a</sup> – P < 0,05; LSM – průměrný nejmenší čtverec; SE – střední chyba; KKS – kompletní krmná směs; MLLT – *musculus longissimus lumborum et thoracis*; MGM – *musculus gluteus medius*

## Seznam literatury

- Barros NM, Puzer L, Tersariol IL, Oliva ML, Sampaio CA, Carmona AK, Motta G (2004): Plasma prekallikrein/kallikrein processing by lysosomal cysteine proteases. *Biol Chem* 385, 1087 – 1091.
- Brix K, Linke M, Tepel C, Herzog V (2001): Cysteine proteinases mediate extracellular prohormone processing in the thyroid. *Biol Chem* 382, 717 – 725.
- Dunn AD, Crutchfield HE, Dunn JT (1991): Thyroglobulin processing by thyroidal proteases. Major sites of cleavage by cathepsins B, D, and L. *J Biol Chem* 266, 20198 – 20204.
- Fontanesi L, Davoli R, Yerle M, Zijlstra C, Bosma AA, Russo V (2001): Regional localization of the porcine cathepsin H (*CTSH*) and cathepsin L (*CTSL*) genes. *Anim Genet* 32, 321 – 323.
- Fontanesi L, Speroni C, Buttazzoni L, Scotti E, Costa LN, Davoli R, Russo V (2010): Association between cathepsin L (*CTSL*) and cathepsin S (*CTSS*) polymorphisms and meat production and carcass traits in Italian Large White pigs. *Meat Sci* 85, 331 – 338.
- Funkelstein L, Toneff T, Mosier C, Hwang SR, Beuschlein F, Lichtenauer UD, Reinheckel T, Peters C, Hook V (2008): Major role of cathepsin L for producing the peptide hormones ACTH,  $\beta$ -endorphin, and  $\alpha$ -MSH, illustrated by protease gene knockout and expression. *J Biol Chem* 283, 35652 – 35659.
- Hook V, Funkelstein L, Toneff T, Mosier C, Hwang SR (2009): Human pituitary contains dual cathepsin L and prohormone convertase processing pathway components involved in converting POMC into the peptide hormones ACTH,  $\alpha$ -MSH, and  $\beta$ -endorphin. *Endocrine* 35, 429 – 437.
- Knott SA, Marklund L, Haley CS, Andersson K, Davies W, Ellegren H, Fredholm M, Hansson I, Hoyheim B, Lundström K, Moller M, Andersson L (1998): Multiple marker mapping of quantitative trait loci in a cross between outbred Wild boar and Large White pigs. *Genetics* 149, 1069 – 1080.
- Mohamed MM, Sloane BF (2006): Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 764 – 775.
- Rohrer GA, Thallman RM, Shackelford S, Wheeler T, Koochmarie M (2006): A genome scan for loci affecting pork quality in a Duroc-Landrace F<sub>2</sub> population. *Anim Genet* 37, 17 – 27.
- Russo V, Fontanesi L, Davoli R, Nanni Costa L, Cagnazzo M, Buttazzoni L, Virgili R, Yerle M (2002): Investigation of candidate genes for meat quality in dry-cured ham production: the porcine cathepsin B (*CTSB*) and cystatin B (*CSTB*) genes. *Anim Genet* 33, 123 – 131.
- Russo V, Fontanesi L, Scotti E, Beretti F, Davoli R, Nanni Costa L, Virgili R, Buttazzoni L (2008): Single nucleotide polymorphisms in several porcine cathepsin genes are associated with growth, carcass, and production traits in Italian Large White pigs. *J Anim Sci* 86, 3300 – 3314.
- 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.
- Stoka V, Turk V, Turk B (2007): Lysosomal cysteine cathepsins: signalling pathways in apoptosis. *Biol Chem* 388, 555 – 560.
- Stupka R, Šprysl M, Pour M (2004): Analysis of the formation of the belly in relation to sex. *Czech J Anim Sci* 49, 64 – 70.

- Toldrá F, Flores M (1998): The role of muscle proteases and lipases in flavour development during the processing of dry-cured ham. *Crit Rev Food Sci* 38, 331 – 352.
- Walstra P, Merkus GSM (1995): Procedure for assessment of the lean meat percentage as a consequence of the new EU reference dissection method in pig carcass classification. DLO- Research Institute for Animal Science and Health Research Branch, Zeist, The Netherlands, 1 – 22.
- Yang M, Zhang Y, Pan J, Sun J, Liu J, Libby P, Sukhova GK, Doria A, Katunuma N, Peroni OD, Guerre-Millo M, Kahn BB, Clement K, Shi GP (2007): Cathepsin L activity controls adipogenesis and glucose tolerance. *Nat Cell Biol* 9, 970 – 977.
- Zavasnik-Bergant T, Turk B (2006): Cysteine cathepsins in the immune response. *Tissue Antigens* 67, 349 – 355.

Tento příspěvek byl vypracován za přispění výzkumného záměru MSM 6046070901.