
ANALYSIS OF THE ASSOCIATION SINGLE NUCLEOTID POLYMORPHISM IN THE GENE PDK4 WITH MEAT PERFORMANCE

Kratochvílová L., Knoll A.

Department of Animal Morphology, Physiology and Genetics, Faculty of Agronomy,
Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xkratoc4@node.mendelu.cz

ABSTRACT

This work deals with the possible impact of selected single-nucleotide polymorphism in the gene PDK4 on three parameters of pig meat production. These are backfat thickness, average daily gain and lean meat content. Testing took place on a set of 71 pigs of Large White breed. PCR (polymerase chain reaction) and RFLP (restriction fragment length polymorphism) were used as the polymorphism detection methods.

Frequency of genotypes was calculated in the test group and subsequently was performed association analysis of commercial properties. This demonstrated statistically significant increase/decrease in average daily growth of backfat between genotypes AA and AB and also increase/decrease of meat lean content between genotypes AA and BB.

Key words: candidate gene, QTL, meat production, PDK4, pig.

ÚVOD

Od dob domestikace hospodářských zvířat lidé manipulovali s geny těchto zvířat pomocí selektivního páření tj. výběru rodičovských párů na základě exteriéru. Na počátku dvacátého století vznikla s pomocí biometrie a mendelistické genetiky genetika kvantitativních znaků, která se stala základem pro teorii šlechtění. Ta je úspěšná pro zvyšování užitkovosti a zároveň dokáže eliminovat některé nežádoucí doprovodné projevy. Analýza genomu pomocí DNA technologie umožňuje identifikaci jednotlivých genů podmiňujících užitkové vlastnosti a tím také efektivnější pozitivní selekci požadovaných vlastností a negativní selekci vlastností nežádoucích (ŠPRYCL, 2002).

Při mapování prasečího genomu bylo nalezeno mnoho genů, u nichž se předpokládá nebo je již potvrzen vliv na nějakou vlastnost. Pokud je např. pomocí komparativního mapování identifikován gen, u něhož se předpokládá vliv na nějakou důležitou vlastnost, je tento gen testován. Možným způsobem testování asociace daného genu s už konkrétními vytipovanými vlastnostmi je provedení asociační analýzy.

Gen *PDK4* kóduje enzym pyruvátdehydrogenázu 4, u něhož se předpokládá, že může mít velký význam pro kontrolu činnosti pyruvátdehydrogenázového komplexu ve svalcích. Gen *PDK4* byl v minulosti zkoumán ve velké míře hlavně u člověka, mnoho prací se zabývalo jeho vlivem na Diabetes Mellitus 2. stupně a inzulínovou rezistencí. Prasečí gen *PDK4* se stal objektem zkoumání vědeckých týmů o něco později než ten lidský. Nejčastěji bývá zkoumána exprese *PDK4* v různých tkáních např. při hladovění (WU a kol., 2000), dále byl tento gen dáván do souvislosti s hybernací u savců. Několik prací se též zabývá ovlivňováním exprese genu *PDK4* glukokortikoidy a inzulínem. Prasečí gen *PDK4* byl lokalizován na chromozomu 9 (9q12 ± 1/3q21) (DAVOLI a kol. 2000). Kóduje 407 aminokyselin a jeho molekulární hmotnost je 46,17 kDa.

MATERIÁL A METODIKA

Testovaná skupina: jednalo se o skupinu prasnic plemene české bílé ušlechtilé, u nichž se v letech 1992 – 1997 sledoval průměrný denní přírůstek (g) od narození do hmotnosti 90 kg. In vivo se měřila výška hřbetního tuku (cm), zjištěn byl obsah libového masa (%) pomocí ultrasondy PIGLOG 105 (SFK, Soborg, Denmark) (Tab. 1). Případné odchylky se přepočítávaly pomocí regresní křivky. DNA byla získána z krve těchto zvířat. Laboratorní práce byla provedena ve výukové laboratoři Ústavu morfologie, fyziologie a genetiky Mendelovy univerzity v Brně.

Tab. 1 Popisná charakteristika zkoumaného souboru prasnic plemene bílé ušlechtilé

Znak	n	průměr	s_d	min	max
Průměrný denní přírůstek	71	596,97	40,79	484,00	667,00
Výška hřbetního tuku	71	1,002	0,14	0,71	1,33
Obsah libového masa	71	59,25	1,59	54,20	63,00

Výška hřbetního tuku měřená v centimetrech, obsah libového masa v gramech, průměrný denní přírůstek v %, s_d – směrodatná odchylka, min – minimální hodnota, max - maximální hodnota sledovaných znaků.

PCR: probíhala na termálním cykleru Gene AMT PCR System 2004 (AB Applied Biosystems).

Složení reakční směsi je zobrazeno v tabulce 2. Teplotní profil je popsán v tabulce 3. Po proběhnutí amplifikace byla provedena kontrola pomocí gelové elektroforézy na 3% gelu. Pro PCR byly použity markery od firmy Fermentas.

PCR optimalizovaná pro termální cykler:

Použité primery: TCA TTG CTT ATC CAT TCC AAA GA PDK4 F (23-mer)

GGC AAA TGA ATC AGG ACA CTG A PDK4 R (22-mer)

Tab. 2 Optimalizovaná reakční směs pro PCR: metodika dle Zrůstové (2010)

HotStarTaq Master Mix (Qiagen)	7,5 μ l
H ₂ O	5,9 μ l
Primer PDK4 F	0,3 μ l
Primer PDK4 R	0,3 μ l
Templátová DNA	1 μ l
Celkový objem	15 μ l

Tab. 3 Teplotní profil PCR

Počáteční denaturace		95°C/ 15 min.
Denaturace		95°C/ 20 s.
Annealing	35 cyklů	58°C/ 30 s
Elongace		72°C/ 30 s.
Závěrečná elongace		72°C/ 7 min
Konečné zchlazení		4°C/ ∞

PCR_RFLP:

Detekce polymorfizmu v genu PDK4: testováno metodou PCR – RFLP. Byla použita restriční endonukleáza BseRI (odvozená od *Bacillus species*).

Restriční místo *BseRI*:

5'...GAGGAG(N)₁₀▼...3'

3'...CTCCTC (N)₈▼...5'

SNP bylo identifikováno na pozici 647 v intronu 10 (647G>A). Alela A má v této pozici adenin a neobsahovala restriční místo a tedy nedocházelo ke štěpení a velikost jediného fragmentu (shodného s velikostí PCR produktu) byla 298 bp. Alela B měla v tomto místě guanin, obsahovala štěpné místo a po naštěpení restriční endonukleázou BseRI vznikly dva fragmenty o velikosti 167 a 132 bp (ZRŮSTOVÁ, 2010). Pro ověření byly vybrané vzorky sekvenovány.

Složení reakční směsi a pořadí je popsáno v tabulce 4.

Tab. 4 *Složení reakční směsi pro RFLP*

H ₂ O	8,25 µl
Pufr N2	1,5 µl
<i>BseRI</i>	0,25 µl
PCR produkt	5 µl
Celkový objem	15 µl

Sekvenování: Sekvenační směs (Tab.5) byla připravena z přečištěného PCR produktu, (přečištěný pomocí QIAGEN - MinElute Reaction Cleanup Kit), specifického primeru a kitu Big Dye Terminator Cycle Sequencing v1.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) doplněná destilovanou vodou na celkový objem reakce 20 µl. Sekvenační reakce probíhala v amplifikátoru GeneAmp®PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) za následujících teplotních a časových podmínek: 96 °C/1 min – (96 °C/10s – 50 °C/5s – 60 °C/4min) 25x – 4/∞.

Tab. 5 *Reakční směs pro sekvenační PCR*

BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v1.1 (Applied Biosystems)	4µl
Pufr	2 µl
Primer PDK F	0,32 µl
Destilovaná H ₂ O	12,68 µl
PCR produkt	1 µl
Celkový objem	20 µl

Asociační analýza: byla provedena pomocí programu SAS for Windows 9.1.4. (SAS Institute Inc., 2004). Využita byla metoda GLM – obecný lineární model umožňující zkoumání vlivu jednoho nebo více faktorů na několik proměnných současně. Pro výpočet asociací byla použita rovnice:

$$y_{ijkl} = \mu + \text{gen}_i + o_j + m_k + e_{ijkl}$$

μ = průměr

gen_i = pevný efekt genotypu ($i = AA, AB, BB$)

o_j = náhodný efekt j -tého otce

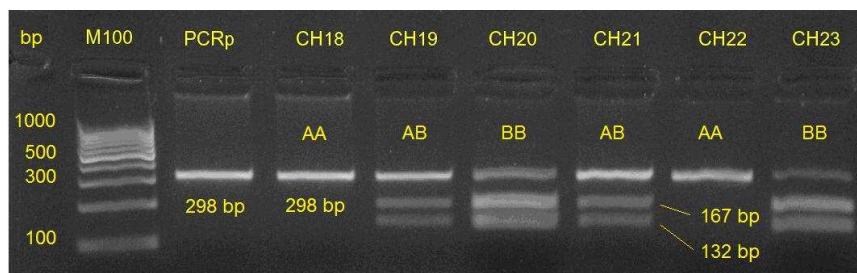
m_k = náhodný efekt k -té matky

e_{ijkl} = reziduum

VÝSLEDKY A DISKUZE

Pomocí PCR byl amplifikován příslušný úsek DNA o velikosti 298 bp. PCR produkt byl vizualizován EtBR na 3% agarózovém gelu. Jako velikostní standard byl využit marker Fermentas. PCR produkt byl štěpen restriční endonukleázou *BseRI* a inkubován při 37°C 24 hodin..

Naštěpené fragmenty byly separovány pomocí agarózové gelové elektroforézy a vizualizovány EtBR



(Obr.1 Genotypy genu *PDK4* štěpené restriční endonukleázou *BseRI* na 3% agarózovém gelu)

M100 – velikostní standard

PCRp – PCR produkt o velikosti 298 bp

Genotypy: AA, AB, BB

U zkoumané skupiny prasat byly pozorovány tyto ukazatele: průměrný denní přírůstek (g) a to do hmotnosti 90 kg, výška hřbetního tuku (cm) a obsah libového masa (%).

Vypočítaná hodnota testového kritéria označená * značí průkaznost při hladině významnosti $P \leq 0,05$, označena ** značí průkaznosti při hladině významnosti $P \leq 0,01$ (STÁVKOVÁ, 2001).

Užitkovost prasat byla popsána běžnými statistickými charakteristikami – aritmetický průměr, střední odchylka od průměru a minimum a maximum (Tab.6).

Tab. 6 Hodnoty masné užitkovosti rozdělené dle genotypů

		průměr	s_d	min	max
Genotyp AA	Přírůstek	577,93	43,85	484,00	640,00
	Hřbetní tuk	1,05	0,17	0,76	1,33
	Obsah LM	58,80	1,99	54,20	61,50
Genotyp AB	Přírůstek	602,45	42,07	491,00	667,00
	Hřbetní tuk	1,01	0,11	0,71	1,24
	Obsah LM	59,14	1,39	56,00	62,10
Genotyp BB	Přírůstek	605,20	26,19	562,00	656,00
	Hřbetní tuk	0,93	0,13	0,74	1,18
	Obsah LM	60,03	1,52	57,30	63,00

LM – libové maso, s_d – směrodatná odchylka, min – minimální hodnota, max - maximální hodnota sledovaných znaků.

Tab. 7 Porovnání genotypů metodou nejmenších čtverců

Sledované vlastnosti	Genotypy		
	AAxAB	AAxBB	BBxAB
Přírůstek	0,0453*	0,0643	0,8197
Hřbetní tuk	0,3544	0,0182*	0,0510
Libové maso	0,4804	0,0348*	0,0633

* $P \leq 0,05$ statistiky průkazný rozdíl, $P \leq 0,1$ blížící se průkaznosti

GLM analýzou byly vyhodnoceny parametry masné užitkovosti plemene české bílé ušlechtilé u jednotlivých genotypů. Při hladině významnosti $P \leq 0,05$ se jako statisticky průkazný jeví rozdíl v hodnotách mezi genotypy AA a AB u průměrného denního přírůstku.

Dále byl stanoven průkazný rozdíl mezi genotypy AA a BB u výšky hřbetního tuku, vyšší hodnoty vykazoval genotyp AA (Tab. 10). Zjištěná hodnota průkaznosti se blíží vysoce průkaznému rozdílu $P \leq 0,01$.

Pro obsah libového masa byl statisticky průkazný rozdíl mezi genotypy AA a BB ($P \leq 0,05$), vyšší hodnoty vykazoval genotyp BB. Rozdíl mezi genotypy AB a BB se statistické průkaznosti blíží ($P \leq 0,1$) (Tab.7).

V této práci byl testován jednonukleotidový polymorfismus v genu *PDK4*, nacházející se v intronu 10 v pozici 674A>G na prasečím chromozomu 9 (SSC9). Asociační analýza souboru 71 prasnic se třemi znaky masné užitkovosti prokázala průkazné rozdíly mezi genotypy AA a AB pro průměrný denní přírůstek, ve prospěch heterozygotního genotypu. SSC9 zkoumali ve své práci též Quintanilla a kol. (2001), na křížencích plemene Large White a Meishan. U testovaných QTL na tomto chromozomu zjistili statisticky průkazný vliv na průměrný denní přírůstek a též na váhu těla v 22 týdnech věku.

U výšky hřbetního tuku jsem zjistila statisticky průkazný rozdíl mezi genotypy AA a AB, vyšší hodnoty vykazoval homozygotní genotyp AA, což je možno porovnat s výsledky Lan a kol. (2009), kde vyšší hodnoty pro výšku hřbetního tuku vykazoval též homozygotní genotyp GG. Zde se však jednalo o křížence Large White a čínského plemene Meishan, což je původní čínské plemeno s vysokou plodností, pomalým růstem a silnou protučněností. Vlastní naměřené hodnoty se tedy značně liší, což je způsobeno právě touto odlišností.

Lan a kol. (2009) též uvádějí, že selekce na větší množství masa může vést ke snížení jeho kvality, stejné stanovisko ve své práci uvedli v roce 2000 Davoli a kol.

U obsahu libového masa jsem zjistila statisticky průkazný rozdíl mezi genotypy AA a BB, vyšší hodnoty měl genotyp BB. Rozdíl mezi genotypy AB a BB se statistické průkaznosti blíží. Lan a kol. (2009) zkoumal poměr mezi masem a tukem a došli k závěru, že vyšší poměr, tedy větší obsah masité části vykazoval genotyp GA. Tento genotyp však měl též vyšší hodnoty intramuskulárního tuku a nižší výšku hřbetního tuku.

Zrůstová (2010) testovala větší soubory, konkrétně 216 jedinců plemene české bílé ušlechtilé, 105 jedinců české landrase a 96 přeštických černostrakatých prasat. Právě velikost souboru (také náhodnost výběru jedinců do těchto souborů) je možno považovat za jednu z příčin nesouladu u některých posuzovaných hodnot. Tato analýza zahrnovala gen *PDK4*, konečné fenotypové vlastnosti a tedy i naměřené a vypočtené hodnoty mohly být ovlivněny jinými geny a také zde mohlo mít vliv prostředí.

ZÁVĚR

Ze zde prezentovaných výsledků je patrné že, kauzální gen, u kterého by se potvrdil vliv na některé z vlastností masné užitkovosti v této oblasti nebyl dosud nalezen. Je tedy nadále nutné podrobovat tuto oblast prasečího genomu dalšímu zkoumání. Nicméně vzhledem k charakteru testovaného

polymorfizmu (leží v nekódující oblasti) je možné usuzovat na vazbu polymorfních míst a tato nalezená polymorfní místa využít jako možné markery.

Gen *PDK4* byl zkoumán jako kandidátní gen pro vlastnosti masné užitkovosti prasat. Byla zde testována asociace jednonukleotidového polymorfizmu 674A>G v intronu 10 s těmito vlastnostmi: výška hřbetního tuku (cm), průměrný denní přírůstek (g) a obsah libového masa (%). Detekce polymorfizmu byla provedena metodou PCR – RFLP. Příslušný úsek DNA o velikosti 298 bp byl amplifikován pomocí PCR a dále štěpen restrikční endonukleázou *BseRI*. Na základě přítomnosti polymorfního místa se odlišily dvě alely. Alela *A* neobsahovala restrikční místo a zůstala tedy po působení *BseRI* nerozštěpená. Alela *B* obsahovala restrikční místo a štěpila se na dva fragmenty o velikosti 164 a 132 bp.

Statistickou analýzou pomocí programu SAS byl vyhodnocen vliv SNP 674A>G v genu *PDK4* na tři vybrané ukazatele masné užitkovosti prasat. Byla použita GLM analýza a metoda nejmenších čtverců.

Vliv genu *PDK4* byl shledán jako statisticky průkazný ($P \leq 0,05$) u průměrného denního přírůstku mezi genotypy *AA* a *AB*, u obsahu libového masa mezi genotypy *AA* a *BB*. U výšky hřbetního tuku byla nalezena statistická průkaznost mezi genotypy *AA* a *BB*, rozdíl mezi genotypy *AB* a *BB* se statistické průkaznosti blíží ($P \leq 0,01$). Z výsledků této práce nelze usuzovat na jednoznačný pozitivní vliv alel *A* nebo *B* na sledované parametry masné užitkovosti. Nabízí se zde tedy možnost dalšího testování možných polymorfních míst tohoto genu a celého SSC9, využití větších souborů prasat a zahrnutí více parametrů masné užitkovosti, ve snaze objevit příčinný gen, jež by významnou měrou přispěl k úspěšné selekci prasat.

LITERATURA

- ARAKI M., MOTOJIMA K. *Identification of ERRalpha as a specific partner of PGC-1alpha for the activation of PDK4 gene expression in muscle*. FEBS Journal [online]. 2006, 8, 273, [cit. 2010-04-27]. Dostupný z WWW: <<http://www3.interscience.wiley.com/journal/118635129>>.
- DAVOLI R., BIGI D., FOUNTANESI L., ZAMBONELLI P., YERLE M., ZIJLSTRA C., BOSMA A. A., ROBIC A., RUSSO V. *Mapping of 14 expressed sequenced tags (ESTs) from porcine skeletal muscle by somatic cell hybrid analysis*. Animal Genetics [online]. 2000, 31, 6, [cit. 2010-04-22]. Dostupný z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11167527>>.
- KNOLL A., URBAN T. ., *Aktuální metody používané v molekulární genetice zvířat*. In Genetické dny : Sborník referátů XX. Brno : MZLU, 2002. s. 31-34. ISBN 80-7157-607-7.
- LAN J., LEI M., ZHANG Y., WANG J., FENG X., XU D., GUI J., XIONG Y. *Characterization of the porcine differentially expressed PDK4 gene and association with meat quality*. Molecular biology reports. Springer Netherlands. Volume 36, Number 7 / September, 2009. ISSN 1573-4978.

QUINTANILLA R, MILAN D, BIDANEL JP. *A further look at quantitative trait loci affecting growth and fatness in a cross between Meishan and Large White pig populations. Genetics Selection Evolution* [online]. 2002, 34, [cit. 2010-04-27]. Dostupný z WWW: <<http://www.gsejournal.org/content/34/2/193>>.

ROSYPAL S., DOŠKAŘ J., PETRZIK K., RŮŽICKOVÁ V. *Úvod do molekulární biologie. čtvrtý díl, Molekulární biologie rostlinných virů, priony, molekulární evoluce, vznik života, metody molekulární biologie, genové inženýrství*. GRAFEX, Blansko, 2002, ISBN 80-902562-4-4

SAS Institute Inc., 2004, SAS/STAT 9.1 User's guide, 2004, SAS Institute Inc., Cary, NC.

STÁVKOVÁ J., DUFEK J. *Biometrika*, MZLU Brno, 2001, dotisk 2005, 194 stran, ISBN 80-7157-486-4

ŠPRYCL M., STUPKA R., *Genetika v chovu prasat: Speciál plus, Je genetika a reprodukce alfou a omegou chovu zvířat?*. Farmář, leden 2002, str. 44-45, ISSN 1210-9789

WU P., BLAIR P. V., SATO J., POPOV, K. M., HARRIS M. A. *Starvation Increases the Amount of Pyruvate Dehydrogenase Kinase in Several Mammalian Tissues*. *Biochemistry and Biophysics* [online]. 2000, 381, 1, [cit. 2010-04-26]. Dostupný z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11019813>>.

ZRŮSTOVÁ J., *Analýza genů PBEF1, PDK4 a PRKAR2B na chromozómu 9 asociovaných s tukem u prasat*. Disertační práce, Brno, Mendelu, 2010 (neuveřejněno)