

## POLYMORPHISMS OF BOVINE CALPASTATIN GENE (CAST) IN SLOVAK SPOTTED BREED

Michal Gábor, Anna Trakovická, Martina Miluchová

### ABSTRACT

The calpastatin gene is the member of the calpains/calpastatin proteolytic system and inhibits  $\mu$ -calpain and m-calpain activity and, therefore, plays key role in the tenderization process. The single nucleotide polymorphisms (SNPs) in this gene were using to design commercially genetic markers panels GeneSTAR Tenderness and Igenity TenderGENE. The work was oriented to identification of UoG-CAST and CAST-T1 polymorphisms of bovine calpastatin gene (CAST) and analysis of genotype structure in population of Slovak spotted breed. The polymorphisms of CAST gene was studied in a group of 38 bulls. Bovine genomic DNA was isolated from sperm by commercial kit NucleoSpin Bood (Macherey Nagel). Detection of the CAST polymorphisms was analyzed by PCR-RFLP method with using restriction enzyme *RsaI* for UoG-CAST and *DdeI* for CAST-T1. In the population of Slovak spotted breed included in the study were detected homozygote genotype CC – 44.74 %, heterozygote genotype CG – 44.74 % and homozygote genotype GG – 10.52 % for marker UoG-CAST. Results point out that frequency of allele C was 67.11 % and frequency of allele G was 32.89 %. We detected the following frequencies for marker CAST-T1: homozygote genotype AA – 47.37 %, heterozygote genotype AG – 39.47 % and homozygote genotype GG – 13.16 %. Frequency of favour mutant allele A was 67.11 % and wild allele G was 32.89 %.

**Keywords:** cattle, tenderness, SNPs, UoG-CAST, CAST-T1.

### ÚVOD

Jemnosť mäsa je jedným z hlavných charakteristík kvality mäsa hovädzieho dobytká. Selektia mäsového dobytká zameraná na zlepšenie jemnosti mäsa je ale dosť komplikovaná, pretože tento znak má veľkú variabilitu nielen medzi jednotlivými plemenami ale aj jedincami rovnakého plemena. Práve z toho dôvodu sa v poslednej dobe začínajú využívať DNA testy založené na genotypovaní zvierat na prítomnosť jednotlivých mutácií, pri ktorých bola preukázaná asociácia medzi ich prítomnosťou a zvýšenou jemnosťou mäsa.

Zlepšenie stupňa krehkosti mäsa v podmienkach *post mortem* je vo všeobecnosti závislé od zjemnenia myofibrilárnej štruktúry svalu prostredníctvom endogénnych proteolytických enzýmov. Endogénny kalpain-kalpastatínový komplex predstavuje hlavnú úlohu pri proteolýze svalových proteínov počas zrenia v *post-mortem*. Kalpaíny predstavujú všadeprítomné cytoplazmatické cysteínové proteázy, ktorých aktivita je viazaná na prítomnosť vápnika (Sorimachi et al., 1997). Plnia kľúčovú úlohu pri zretí mäsa *post mortem* (Koochmaraie et al., 1996), kedy proteolyticky degradujú myofibrily svalových vlákien. Dôležitou súčasťou kalpainového systému proteáz je ich endogénny inhibítor kalpastatín, ktorý bol nájdený vo všetkých tkanivách obsahujúcich kalpaíny. Kalpastatín získaný z kostrového svalstva je jednoduchý polypeptid, ktorého vnútorná štruktúra je tvorená štyrmi opakujúcimi sa doménami 1, 2, 3 a 4 a N – terminálnou oblasťou označovanou ako doména L alebo XL (Maki et al., 1991), ktorá sa vyznačuje variabilnou veľkosťou (Goll et al., 1999). Otsuka a Goll (1987) zistili, že neporušená kalpastatínová molekula je schopná inhibovať najmenej štyri molekuly kalpainu, práve vplyvom inhibičných aktivít domén 1 – 4. Lonergan et al. (2001) zistili, že vo svaloch v *post mortem* je kalpastatín degradovaný.

Gén pre kalpastatín označovaný ako CAST môžeme na základe výsledkov početných štúdií vykonaných najmä na hovädzom dobytku považovať za kandidátny

gén pre jemnosť mäsa. Gén kódujúci vznik hovädzieho kalpastatínu je lokalizovaný na 7. chromozóme s relatívnou pozíciou 117,8 cM (Bishop et al., 1993).

Barendse (2002) objavil v 3'UTR oblasti jeden z dvoch doposiaľ najdôležitejších polymorfizmov CAST génu. Podstatou jednoduchého nukleotidového polymorfizmu (SNP) je zámena G za A v pozícii 2959 sekvencie AF159246. Početné štúdie potvrdzujúce silnú asociáciu tohto SNP s jemnosťou hovädzieho mäsa umožnili využitie SNP s označením CAST-T1 génu CAST v komerčnom teste GeneSTAR Tenderness, ktorý spolu s vybranými SNP  $\mu$ -kalpainu CAPN316 a CAPN4751 tvoria základný panel pre predikciu jemnosti mäsa hovädzieho dobytká.

Druhé najvýznamnejšie SNP lokalizované v 5. intróne génu CAST popísali Schenkel et al. (2006). Nové SNP lokalizované v pozícii 282 sekvencie AY008267 spočívajúce v zámene G za C bolo preukazateľne spojené so znížením hodnoty Warner-Bratzlerovej strižnej sily pri hovädzom mäse. Toto SNP dostalo pomenovanie UoG-CAST a je súčasťou druhého komerčného testu s označením Igenity TenderGENE. Súčasťou spomínaného komerčného testu na odhadnutie jemnosti mäsa na základe genetickej predispozície sú podobne ako v predchádzajúcom teste GeneSTAR Tenderness markery CAPN316 a CAPN4751 génu CAPN1 kódujúceho vznik  $\mu$ -kalpainu. Štúdia Van-Eennaama et al. (2007) potvrdila platnosť oboch komerčných testov GeneSTAR Tenderness a Igenity TenderGENE pri genotypovaní zvierat hovädzieho dobytká a tým potvrdila silnú asociáciu oboch polymorfizmov génu CAST s jemnosťou mäsa.

Cieľom práce bolo poskytnúť prvotnú informáciu o SNP polymorfizmoch CAST-T1 a UoG-CAST génu CAST v populácii býkov slovenského strakatého dobytká.

**MATERIÁL A METÓDY**

Pre štúdium polymorfizmov vybraného génu boli použité inseminančné dávky 38 býkov slovenského strakatého plemene. Extrakcia DNA bola uskutočnená pomocou komerčného kitu NucleoSpin Blood (Macherey Nagel) s menšími modifikáciami.

Štúdium SNP polymorfizmov UoG-CAST a CAST-T1 génu CAST boli uskutočnené metódou PCR-RFLP. PCR reakcie boli optimalizované na gradientovom termocykléri C1000 (Biorad). Na amplifikáciu špecifických úsekov génu CAST sme použili oligonukleotidové primery (tabuľka 1) navrhnuté pomocou programu BatchPrimer3 v1.0 (You et al., 2008). Do PCR reakčnej zmesi pre oba PCR produkty v celkovom objeme 25 µl sme pridávali zložky v nasledovných výsledných koncentráciách: 1 x reakčný pufor (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTP 0,2 mM, mix primerov For a Rev 8 pM, 1 U Taq DNA polymerázy (Fermentas) a 50 ng DNA.

**Tabuľka 1.: Sekvencie navrhnutých primerov a teplota annealingu (Ta).**

Marker	Primer	Ta
UoG-CAST	For: 5'-AAGAAGTAAAGCCAAAGGAACACACAG-3' Rev: 5'-CTGTATCTGATGAGTGCTGGGTAGG-3'	60 °C
CAST-T1	For: 5'-TTCTCATGACCCCTTTCCTC-3' Rev: 5'-CCAGGGTCTCTACGATTAGCA-3'	57 °C

Pre RFLP analýzu boli použité restriktčné enzýmy FastDigest RsaI (Fermentas) a FastDigest DdeI (Fermentas) popísané v tabuľke 2. Vzniknuté štiepne fragmenty boli nanosené na 2,5 % agarózový gél. Gél obsahoval interkalačnú farbičku GelRed (Biotium). Elektroforéza prebiehala v 1 x SB roztoku (Brody a Kern, 2004) pri napätí 200 V po dobu 15 minút. Po skončení elektroforézy sme nadelené fragmenty DNA detekovali UV transiluminátorom a dokumentovali pomocou fotodokumentačnej jednotky C7070 Olympus.

**Tabuľka 2. : Restriktčné enzýmy a štiepne fragmenty PCR produktov.**

Marker	Enzým	Teplota	Štiepne fragmenty
UoG-CAST	FastDigest RsaI	37 °C	C – 459 bp G – 268 bp, 191 bp
CAST-T1	FastDigest DdeI	37 °C	A – 115 bp, 20 bp G - 135 bp

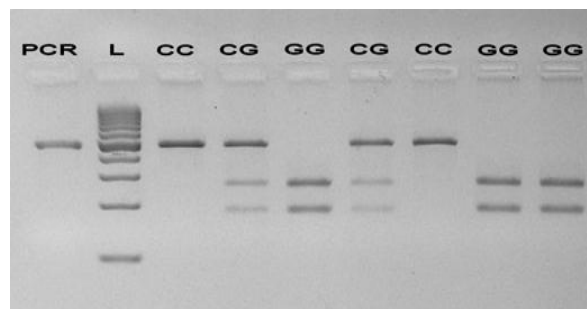
**VÝSLEDKY**

Amplifikované PCR produkty o veľkosti 459 bp (UoG-CAST) a 135 bp (CAST-T1) boli štiepené enzýmami RsaI (obrázok 1) a DdeI (obrázok 2) a vizualizované v 2,5 % agarózovom géle s obsahom farbičky GelRed (Biotium).

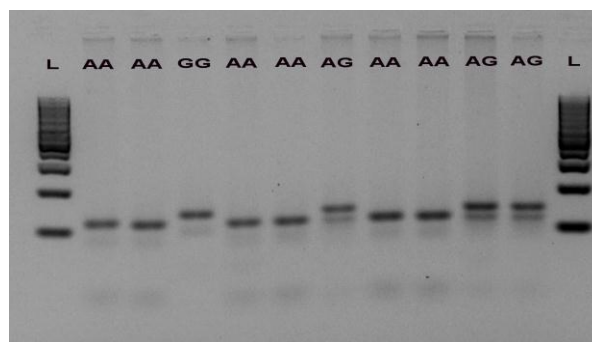
V populácii hovädzieho dobytku v celkovom počte 38 zvierat boli pre marker UoG-CAST zistené všetky tri genotypy a to genotyp CC (459 bp) 17 zvieratá, genotyp CG (459 bp, 268 bp, 191 bp) 17 zvierat a genotyp GG (268bp, 191 bp) 4 zvierat.

Výskyt troch genotypov v analyzovanej populácii sme zistili aj pre marker CAST-T1. Genotyp AA (115 bp, 20

bp) v počte zvierat 18, genotyp AG (135 bp, 115 bp, 20 bp) v počte 15 zvierat a genotyp GG (135 bp) v počte 5 zvierat. Výsledné frekvencie alel a genotypov pre oba markery znázorňuje tabuľka 3.



**Obrázok 1. :Reprezentatívne výsledky PCR-RFLP markeru UoG-CAST na 2,5 % agarózovom géle.** PCR produkt – 459 bp, L – ladder 100 bp (Fermentas), CC genotyp (459 bp), CG genotyp (459 bp, 268 bp, 191 bp), GG genotyp (268 bp, 191 bp).



**Obrázok 2.: Reprezentatívne výsledky PCR-RFLP markeru CAST-T1 na 2,5 % agarózovom géle.** L – ladder 100 bp (Fermentas), AA genotyp (115 bp, 20 bp), AG genotyp (135 bp, 115 bp, 20bp), GG genotyp (135 bp). Fragment o veľkosti 20 bp je viditeľný slabšie v spodnej časti fotografie.

**Tabuľka 3.: Frekvencie alel a jednotlivých genotypov pre markery UoG-CAST a CAST-T1.**

Marker	Genotypy			Alely	
	CC	CG	GG	C	G
UoG-CAST	0,4474	0,4474	0,1052	0,6711	0,3289
CAST-T1	AA	AG	GG	A	G
	0,4737	0,3947	0,1316	0,6711	0,3289

Z údajov tabuľky 1 je vidieť prítomnosť všetkých troch genotypov oba markery. V analyzovanej skupine zvierat je vidieť prevahu preferovaných genotypov AA (44,74 %) a CC (47,37%) nad homozygotnými genotypmi GG (10,52 %) markeru UoG-CAST a GG (13,16 %) markeru CAST-T1. Frekvencia výskytu heterozygotov AG (39,47 %) a CG (44,74 %) dosahovala približne rovnakú frekvenciu ako homozygotné genotypy AA a CC obidvoch markerov. Výsledky poukazujú na vysoký a úplne identický podiel frekvencií

preferovaných alel A (67,11 %) a C ( 67,11%) nad alelami G (32,89 %) markeru UoG-CAST a G (32,89 %) markeru CAST-T1.

V tabuľke 4 je znázornený počet býkov s kombináciami jednotlivých genotypov pre oba markery génu CAST.

**Tabuľka 4.: Kombinácia genotypov markerov UoG-CAST a CAST-T1 génu CAST v analyzovanej populácii 38 býkov slovenského strakatého dobytká.**

		CAST-T1		
		AA*	AG	GG
UoG-CAST	CC*	8	6	3
	CG	9	8	-----
	GG	-----	2	2

\*- znázorňuje preferované genotypy pre oba markery

## DISKUSIA

Cieľom našej štúdie bolo zistiť SNP polymorfizmy génu CAST asociovaných s jemnosťou mäsa. Význam skúmaných markerov UoG-CAST a CAST-T1 dokazuje, fakt, že uvedené markery tvoria základ dvoch komerčných DNA testov, ktoré slúžia na predikciu jemnejšieho mäsa pri pri mäsových plemenách hovädzieho dobytká. Marker UoG-CAST je súčasťou testu Igenity *TenderGENE*, a marker CAST-T1 tvorí základ genetického testu *GeneSTAR Tendernes*. Výsledky prezentované v tabuľke 1 dokazujú, že uvedené markery boli v analyzovanej populácii slovenského strakatého dobytká polymorfne a zároveň sme zistili vysoký podiel požadovaných genotypov AA a CC. Vysoký podiel alel A a C oboch markerov potvrdzuje výsledky viacerých štúdií (**Van Eeneennaam et al., 2007, Page et al. 2004**), ktoré popisujú vyšší výskyt oboch alel pri mäsových plemenách pôvodu *Bos taurus* v porovnaní s plemenami *Bos indicus* (**Casas et al., 2005, Smith et al., 2000 a Van Eenennaam et al., 2007**). Nízke výsledky frekvencie genotypu AA markeru

## LITERATÚRA

BARENDSE, W. G. 2002. DNA markers for meat tenderness. International patent application No. PCT/AU02/00122. World Intellectual Property Org. Int. Publication No. WO 02/064820 A1.

BISHOP, M. D., KAPPES, S. D., KEELE, J. W., STONE, R. T, SUNDEN, S. L. F., HAWKINS, G. A., SOLINAS TOLDO S., FRIES, R., GROSZ, M. D., YOO, J., BEATTIE, C. W., 1994. A genetic linkage map for cattle. In: *Genetics*, vol. 136, 1994, p. 619-639.

BRODY, R. J., KERN, S.E. 2004. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis, In *Biotechniques*, vol. 36, 2004, p. 214–216.

CASAS, E., WHITE, S. N., RILEY, D. G. et al. 2005. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. In *J. Anim. Sci.*, vol. 83, 2005, p. 13-19.

CURI, A. R., CHARDULO, L. A. L., MASON, C. M., ARRIGONI, B. D.M., SILVEIRA, C.A., OLIVEIRA, N. F., 2009. Effect of single nucleotide

CAST-T1 v populácii plemien pôvodom *Bos indicus* (nellore, brangus, canchim) zistili aj **Curi et al. (2009)**. Nižšia jemnosť mäsa pri *Bos indicus* je zapríčinená redukciami proteolýzy myofibrilárnych proteínov vo svaloch v spojitosti s vyššou aktivitou enzýmu kalpastatín, ktorý pôsobí ako inhibitor kalpainov zodpovedných za proteolýzu mäsa (**Whipple et al., 1990**). Význam markerov UoG-CAST a CAST-T1 popisuje vo svojej práci **Van Eenennaam et al. (2007)**. Okrem frekvencií uvedených v tabuľke 3 sme zistili dostatočne vysoký počet jedincov (8 býkov) s kombináciou oboch preferovaných genotypov AA/CC (tabuľka 4). Približne rovnaký počet jedincov sme zistili aj pre kombináciu genotypov AA/CG (9 býkov), CC/AG (6 býkov) a AG/CG (8 býkov). Asociácia medzi jemnosťou mäsa a prítomnosťou mutantných alel C pre marker UoG-CAST a A pre marker CAST-T1 pre slovenské strakaté plemeno nebola doposiaľ vykonaná. Prípadná preukazná spojitosť medzi kvalitnejším mäsom slovenského strakatého plemena a prítomnosťou oboch markerov by vytvorili možnosť širšieho využitia nášho národného plemena, pri produkcii kvalitnejšieho hovädzieho mäsa.

## ZÁVER

V analyzovanej populácii býkov slovenského strakatého plemena sme detegovali polymorfizmus génu CAST pre markery UoG-CAST a CAST-T1. Frekvencia genotypov CC, CG a GG markeru UoG-CAST bola 44,74 %, 44,74 % a 10,52 %. Podobné frekvencie sme zistili aj pre genotypy AA (47,34 %), AG (39,47 %) a GG (13,16 %) markeru CAST-T1. Zároveň sme detegovali 8 býkov, ktoré mali pre gén CAST kombináciu preferovaných genotypov AA/CC markerov UoG-CAST a CAST-T1. Výsledky našej štúdie poskytli prvotnú informáciu o polymorfizme najvýznamnejších markerov génu CAST. Význam našich výsledkov vyzdvihuje aj fakt, že analyzovanú populáciu tvorili býky využívané v plemenitbe slovenského strakatého plemena.

polymorphisms of CAPN1 and CAST genes on meat traits in Nellore beef cattle (*Bos indicus*) and in their crosses with *Bos taurus*. In *Animal Genetics*, vol. 40, 2009, no. 4, p. 456-462.

KOOHMARAIE, M. 1996. Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. In *Meat Science*, vol. 43, p. 193–201.

LONERGAN, S. M., HUFF-LONERGAN, E., WIEGAND, R. B. 2001. Postmortem proteolysis and tenderization of top loin steaks from brangus cattle. In *Journal of Muscle Foods*, vol. 12, 2001, p. 121-136.

MAKI, M., MA, H., TAKANO, E. ADACHI, Y., LEE, J. W., HATANAKA, M., MURACHI, T., 1991. Calpastatins: biochemical and molecular biological studies. In *Biomedica Biochimica Acta*, vol. 50, 1991, p. 509–516.

OTSUKA, Y., GOLL. E. D. 1987. Purification of the Ca<sup>2+</sup>-dependent proteinase inhibitor from bovine cardiac muscle and its interaction with the milimolar Ca<sup>2+</sup>-dependent proteinase. In *J. Biol. Chem.* vol. 262, 1978, p. 5839–5851.

PAGE, B.T., CASAS, E., QUAAS, R.L., THALLMAN, R.M., WHEELER, T.L., SHACKLEFORD,S.D., KOOHMARAIE, M., WHITE, S.N., BENNETT, G.L.,

KEELE, J.W., DIKEMAN, M.E., SMITH, T.P.L., 2004. Association of markers in the bovine CAPN1 gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. In *J. Anim. Sci.*, vol. 82, 2004, p. 3474–3481.

SCHENKEL, F.S., MILLER, S.P., JIANG, Z., MANDELL, I.B., YE, X., LI, H., WILTON, J.W., 2006. Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. In *Journal of Animal Science*, vol. 84, 2006, p. 291–299.

SMITH, T.P.L.; CASAS, E.; REXROAD, C.E.; KAPPES, S.M.; KEELE, J.W., 2000. Bovine CAPN1 maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat

tenderness. In *J. Animal Science*, vol. 78, 2000, p. 2589–2594.

SORIMACHI, H., ISHIURA, S., SUZUKI, K. 1997. Structure and physiological function of calpains. In *Biochemical Journal*, vol. 328, 1997, p. 721–732.

VAN EENENNAAM, A. L., LI, J., THALLMAN, R. M. QUAAS, R. L., DIKEMAN, M. E., GILL, C. A., FRANKE, D. E., THOMAS, M. G., 2007. Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. In *Journal of Animal science*, vol. 85 (4), 2007, p. 891-900.

WHIPPLE, G., KOOHMARAIE, M., DIKEMAN, M. E., CROUSE J. D., HUNT, M. C., KLEMM, R. D. et al. 1990. Evaluation of attributes that effect longissimus muscle tenderness in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. In *J. Anim. Sci.*, vol. 68, 1990, p. 2716-2728.

**Pod'akovanie:** Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. LPP-0220-09.

### Kontaktná adresa:

Ing. Michal Gábor, PhD. Slovak University of Agriculture, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Department of Genetics and Breeding Biology, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, e-mail: misogabor@yahoo.com

doc. Ing. Anna Trakovická, CSc. Slovak University of Agriculture, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Department of Genetics and Breeding Biology, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, e-mail: anna.trakovicka@uniag.sk

Ing. Martina Miluchová, PhD. Slovak University of Agriculture, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Department of Genetics and Breeding Biology, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, e-mail: martina.miluchova@centrum.sk