

LOCALIZACION CROMOSOMICA Y CARACTERIZACION DEL POLIMORFISMO DEL GEN DE LA 2,4-DIENOIL-COA REDUCTASA (DECR) PORCINA

A. Clop¹, M. Pérez-Enciso², A. Cercós¹, A. Tomás¹, L. Varona², J.L. Noguera², A. Sánchez¹ y M. Amills¹

¹ Unitat de Genètica i Millora Animals, Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193. ² Area de Producció Animal, Centre UdL-IRTA, Rovira Roure 177, Lleida 25198

INTRODUCCION

El análisis, mediante la utilización de microsatélites y mapeo de ligamiento, de la F₂ de un cruzamiento de Landrace e Ibérico reveló la existencia de un QTL en el cromosoma 4 porcino con efectos significativos sobre el porcentaje de ácidos linoleico y oleico en el tejido adiposo subcutáneo, así como sobre el engrasamiento dorsal (Pérez-Enciso et al. 2000). El genotipo Ibérico se hallaba asociado a un mayor engrasamiento de la canal, un menor crecimiento, un menor porcentaje de ácido linoleico y un mayor porcentaje de ácido oleico, respecto del genotipo Landrace (Pérez-Enciso et al. 2000). La posición de este QTL coincide con el descrito por Andersson y colaboradores (1994), en el que se describían asociaciones entre una región del cromosoma 4 porcino y la velocidad de crecimiento, el engrasamiento y la longitud del intestino en un cruce de Large White y jabalí.

El análisis de las correspondencias cromosómicas entre el intervalo del cromosoma 4 porcino que contiene el QTL (71 a 86 cM) y la región genómica homóloga en humano, que corresponde al brazo largo del cromosoma 8 (Goureau et al. 1996), reveló la existencia de un posible gen candidato que explicaría las variaciones observadas respecto al contenido en ácidos grasos oleico y linoleico. Dicho gen codifica la 2,4-dienoil-CoA reductasa (DECR), que es un enzima auxiliar de la β -oxidación de los ácidos grasos. Más concretamente, dicho enzima participa en el metabolismo de los ácidos grasos insaturados con dobles enlaces en posiciones pares e impares, catalizando la reducción de 2,4-dienoil-CoA en trans-3-enoil-CoA (Kunau y Dommès 1978). La 2,4-dienoil-CoA reductasa posee una estructura homotetramérica, se localiza a nivel mitocondrial y se transcribe fundamentalmente en el hígado, riñón, corazón y páncreas (Koivuranta et al. 1994). En humano, el gen DECR tienen un tamaño de 30 Kb y la unidad de transcripción incluye 10 exones y 9 intrones de tamaño variable (Helander et al. 1997). La deficiencia del enzima DECR en humano causa un síndrome fatal caracterizado por la existencia de hiperlisinemia, hipocarnitinemia y la presencia de 2-trans, 4 cis-decadienoilcarnitina en la orina debido a la oxidación incompleta del ácido linoleico (Roe et al. 1990). Los objetivos del presente trabajo consisten en (1) determinar la localización cromosómica del gen DECR porcino y observar si coincide con el intervalo del cromosoma 4 en el que se halla el QTL antes mencionado, y (2) en caso afirmativo, caracterizar el polimorfismo de este gen para analizar su posible influencia sobre el contenido en ácido oleico y linoleico.

MATERIAL Y METODOS

Amplificación del gen DECR porcino: El diseño de *primers* específicos para el segundo exón del gen DECR porcino se realizó mediante el alineamiento de las secuencias ortólogas correspondientes a humano (número de acceso *Genbank*: U94981) y rata (número de acceso *Genbank*: D00569). La identificación de regiones

conservadas entre ambas especies posibilitó la construcción de dos *primers* (FW1: 5'-AGT TTT TCA GTT ATG GGA CAA AAA-3' y REV1: 5'-CAC TGA GCA CCT AGG CTG GA-3') que amplificaban específicamente 2 pares de bases (pb) del intrón 1 y 188 pb del segundo exón del gen DECR porcino. Las condiciones de la reacción de PCR fueron 1.5 mM MgCl₂, 100 μM dNTPs, 0.5 μM de cada *primer*, 200 ng de ADN genómico y 1.25 U de Taq ADN polimerasa en un volumen final de 50 μl. El perfil térmico incluía una etapa de desnaturalización previa del ADN (94° C-1.5 min.) y 94° C-1.5 min., 58° C-2 in, 72° C-2.5 min. durante 35 ciclos. Finalmente se realizó una etapa de extensión final de 72° C-20 min.

Secuenciación del producto amplificado: El producto amplificado se secuenció directamente en 4 individuos mediante el *kit* de secuenciación *ABI PRISM Cycle sequencing kit* (Perkin Elmer Biosystems) para confirmar que realmente correspondía al segundo exón del gen DECR porcino. Las reacciones de secuenciación fueron analizadas en un aparato de electroforesis capilar *ABI PRISM 310* (Perkin Elmer Biosystems). Para obtener una secuencia de mayor calidad, el producto amplificado fue clonado en un plásmido pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y secuenciado en ambas direcciones.

Digestión del producto amplificado con los enzimas de restricción Mael y Bfal: La digestión de 11 μl de producto amplificado con 10 U del enzima *Mael* (Boehringer-Mannheim) se realizó a 45° C-12 horas. Alternativamente, se empleó el enzima de restricción *Bfal* (New England Biolabs) que es un isoesquizómero de *Mael* (22.5 U de enzima, 37° C-12 horas). Los productos de la digestión se analizaron en geles de alta resolución al 2%.

Localización cromosómica del gen DECR porcino: El mapeo del gen DECR porcino se realizó mediante el panel de células somáticas híbridas irradiadas *INRA-Minnesota Porcine Radiation Hybrid (ImpRH)* (Yerle et al. 1998). Para distinguir el gen DECR porcino de su ortólogo en hámster, se diseñaron *primers* que amplificaban específicamente la secuencia porcina. Para ello, se alinearon las secuencias DECR del cerdo, el ratón y la rata y se identificaron dos regiones que presentaban una notable divergencia entre el cerdo y roedores. La secuencia de los *primers* fue FW2: 5'-TTG TAT CAA AGC ACT GAA GCT TTT-3' y REV2: 5'-TGG ACA GAT GAG TTG TCA TTC TT-3'. El volumen de reacción fue de 15 μl, la concentración de magnesio 2 mM y la cantidad de DNA 25 ng. El perfil térmico comprendía una etapa de desnaturalización previa (94° C-2 min.) y 94° C-1 min., 63° C-1 min., 72° C-1 min. durante 32 ciclos. Finalmente, se realizó una etapa de extensión de 72°C -5 min. Los productos amplificados poseían un tamaño de 148 pb y se analizaron en geles de agarosa al 2%. Las PCRs del panel de células somáticas híbridas irradiadas se realizaron por duplicado. Los resultados fueron enviados a la base de datos *ImpRH* (<http://imprh.toulouse.inra.fr>) y analizados *IMpRH mapping tool* (Milan et al. 2000). El mapa de ligamiento del gen DECR se realizó mediante la opción *build* del programa CRI-MAP versión 2.4.

RESULTADOS Y DISCUSION

La secuenciación directa del producto amplificado correspondiente al exón 2 del gen DECR en dos individuos de raza Landrace y dos individuos de raza Ibérica permitió la identificación de un polimorfismo de restricción *Mael* en la posición 114 del producto amplificado debido a una sustitución de una guanina por una citosina (alelo 1: 190 pb, alelo 2: 114-76 pb). La existencia de dicho polimorfismo se confirmó mediante la secuenciación de producto clonado en siete individuos. La secuencia consenso

obtenida mediante el alineamiento de siete clones independientes fue enviada a la base de datos de *Genbank* (número de acceso AF335499). Dicha secuencia posee una identidad del 84% con su ortóloga humana. Este polimorfismo de restricción está asociado a la sustitución de un residuo valina (alelo 1) por un residuo leucina (alelo 2) en la posición 61 de la proteína madura.

El estudio de la segregación del polimorfismo de restricción *Mael* en un pedigrí de 3 generaciones producido a partir de un cruzamiento de Ibérico con Landrace (Pérez-Enciso et al. 2000) demostró la existencia de una herencia autosómica mendeliana para dicho polimorfismo. La frecuencia del polimorfismo *Mael* en cuatro razas de cerdos se indica en la Tabla 1

Tabla 1. Frecuencias alélicas del polimorfismo de restricción *Mael* en distintas razas porcinas

Raza	n	Alelo 1	Alelo 2
Large White	20	0.10	0.90
Landrace	110	0.74	0.26
Pietrain	20	0.55	0.45
Ibérico	49	0.34	0.66

El análisis de los datos obtenidos mediante el panel de células somáticas híbridas irradiadas demostró que el gen *DECR* porcino está posicionado a 13 centiRay (cR) del microsatélite SW1003, es decir muy cerca del centrómero del cromosoma 4. Los resultados del análisis de ligamiento mostraron que la posición más probable del *DECR* se sitúa entre los microsatélites SW839 y S0214, que es compatible con los datos obtenidos a partir del panel de células somáticas híbridas. Es interesante constatar que esta región está dentro del intervalo de confianza para el QTL detectado en el cromosoma 4. Sin embargo, un análisis preliminar donde se incluyó el polimorfismo del *DECR* como efecto fijo, no mostró ningún resultado significativo.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto financiado por la CICYT (AGF99-0284-CO2-02).

BIBLIOGRAFIA

- Goureau ,A., Yerle M., Schmitz A., Riquet J., Milan D., Pinton P., Frelat G. and Gellin J. 1996. *Genomics* 36: 252-262
- Helander, H. M., K.T. Koivuranta, N. Horelli-Koitunen, J.J. Palvimo, A. Palotie, y J.K. Hiltunen. 1997. *Genomics* 46: 112-119.
- Koivuranta K.T., E.H. Hakkola, y J.K. Hiltunen. 1994. *Biochem J.* 304:787-92.
- Kunau, W.H., y P. Dommès. 1978. *Eur. J. Biochem.* 91: 533-544.
- Milan D., Hawken R., Cabau C., Leroux S., Genet C., Lahbib Y., Tosser G., Robic A., Hatey F., Alexander L., Beattie C., Schook L., Yerle M., Gellin J. 2000. *Bioinformatics* 16:558-9.
- Pérez-Enciso, M., A. Clop, J.L. Noguera, C. Ovílo, A. Coll, J.M. Folch, D. Babot, J. Estany, M.A. Oliver, I. Díaz, y A. Sánchez. 2000. *J. Anim. Sci.* 78: 2525-2531.
- Roe, C., D.S. Millington, D.L. Norwood, N. Kodo, H. Sprecher, B.S. Mohammed, M. Nada, H. Schulz, y R. Mc Vie. 1990. *J. Clin. Invest.* 85: 1703-1707.
- Yerle M., Pinton P., Robic A., Alfonso A., Palvadeau Y., Delcros C., Hawken R., Alexander L., Beattie C., Schook L., Milan D., Gellin J. 1998. *Cytogenet Cell Genet.* 82:182-8.