ITEA (2004), Vol. **100A N.° 3,** 192-196

ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD DE LA REGIÓN DE TRANSMEMBRANA DEL GEN DEL RECEPTOR DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO OVINA

J.A. Morán, J.J. Arranz, F. San Primitivo

Departamento de Producción Animal I, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 24071 León.

Introducción

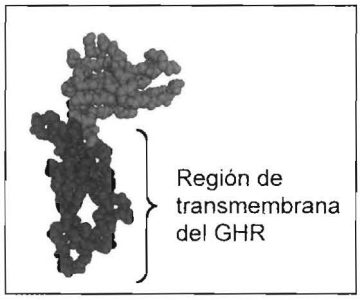
Habitualmente se utilizan marcadores génicos anónimos, especialmente secuencias microsatélite, para realizar mapas de ligamiento. Estos mapas se emplean en la identificación de los genes que influyen sobre los caracteres cuantitativos de interés en producción animal (QTLs). Este método se ha utilizado en diferentes estructuras familiares que constituyen complejos pedigríes (GEORGES *et al.*, 1995; SPELMAN *et al.*, 1996; COPPIETERS *et al.*, 1998; WALLING *et al.*, 2000).

Una segunda aproximación al estudio de QTLs sigue la hipótesis de los genes candidatos. Un gen candidato es aquel que puede estar implicado en la expresión o fisiología de un carácter determinado. Los conocimientos bioquímicos o fisiológicos de que se dispone, permiten predecir si un gen puede ser estructural, regulador o si su actividad afectaría a la cadena bioquímica de síntesis o degradación de sustratos (LYNCH y WALSH, 1998). Esta hipótesis postula que una proporción significativa de la varianza genética de un carácter, se debe a la segregación de diferentes alelos de sus genes candidatos (BRYNE y MCMULLEN, 1996). La estrategia "Gen candidato" ha funcionado eficazmente en la detección de genes que contribuyen en pequeña medida a la varianza total de un carácter y en poblaciones que poseen un bajo poder estadístico en estudios de ligamiento (EBSTEIN *et al.*, 1996; GELERNTER y CROWE, 1997).

Hemos emprendido el estudio de genes candidatos con la pretensión de poder mejorar el esquema de selección de la raza Churra. En la primera etapa, nuestro objetivo es identificar la existencia de variación genética, especialmente la que afecta a la estructura primaria de la proteína. Uno de los genes elegidos es el receptor de la hormona de crecimiento (GHR). Mediante estudios de marcadores microsatélites realizados en nuestro laboratorio, se ha encontrado un indicio de QTL para producción de leche en el cromosoma 16 muy próximo a la localización del marcador AGLA29 (GUTIÉRREZ-GIL, 2004 y EL-ZAREI, 2004). En esta misma región se localiza el locus GHR, por lo que este gen podría ser el responsable de la aparición del QTL. En 1998, ARRANZ *et al.* encontraron un QTL con efecto mayor en la producción y en la composición de la leche. Posteriormente, BLOTT *et al.* 2003, describieron una sustitución F por Y en la posición 279 de la secuencia aminoacídica del exón 8, en la región del dominio transmembrana del GHR, que podía explicar el QTL encontrado. La mutación afecta a la producción de leche (67±16 kg.) y de grasa (-1,4±0.6 kg.). Además, justifica entre el 2,3% y el 5,5% de la varianza del porcenta-

je de grasa y entre el 0,7% y el 2,9% de la varianza de la producción de leche.

El objetivo de este trabajo es identificar la variabilidad existente en la región transmembrana del gen GHR en la raza Churra.



Material y métodos

Se han puesto a punto las condiciones de PCR para la utilización de los cebadores diseñados por BLOTT *et al.* (2003) para los exones 3, 4, 5, 6, 7 y 8 del gen GHR de la vaca.

Para aumentar las posibilidades de encontrar variabilidad, se preparó un panel formado por 30 animales de la raza Churra, 8 de la Castellana, 8 de la Assaff, 8 de la Merina, 4 de la Awassi, 4 de la Manchega, 4 de la Lacaune, 4 de la Latxa y 4 de la Milchschaf. En total 74 muestras diferentes.

Se pusieron a punto las condiciones para amplificar cada uno de los fragmentos que contienen los exones 3, 4, 5, 6, 7 y 8 del gen GHR. Todas las reacciones de PCR funcionaron bien a 60 °C y con concentraciones de $MgCl_2$ que variaron entre 1,5 y 3mM. Para cada fragmento se siguió este perfil PCR: (94 °C-5'), 30 ciclos de (94 °C-30"; 60 °C-40"; 72 °C-40") y 72 °C-60' en termociclados GeneAmp PCR System 9700 de Applied Biosystems.

Cada producto de PCR se sometió a análisis de polimorfismos de cadena simple (SSCP), de forma que se optimizaron las condiciones para maximizar la detección de mutaciones. Posteriormente se secuenciaron representantes de cada uno de los patrones electroforéticos para determinar su genotipo. El alineamiento de las secuencia resaltó los lugares de variación buscados. Se empleó un secuenciador MegaBACE 500 de Amersham Biosciences y ET teminators. Los resultados se comprobaron en la base de datos del NCBI, cuya dirección en internet es http://www.ncbi.mlm.nih.gov, y se procesaron mediante el software poly-Phred. Posteriormente se editaron en el programa Consed. Adicionalmente se diseñó un script de shell que simplifica el análisis con estos paquetes informáticos.

Resultados y discusión

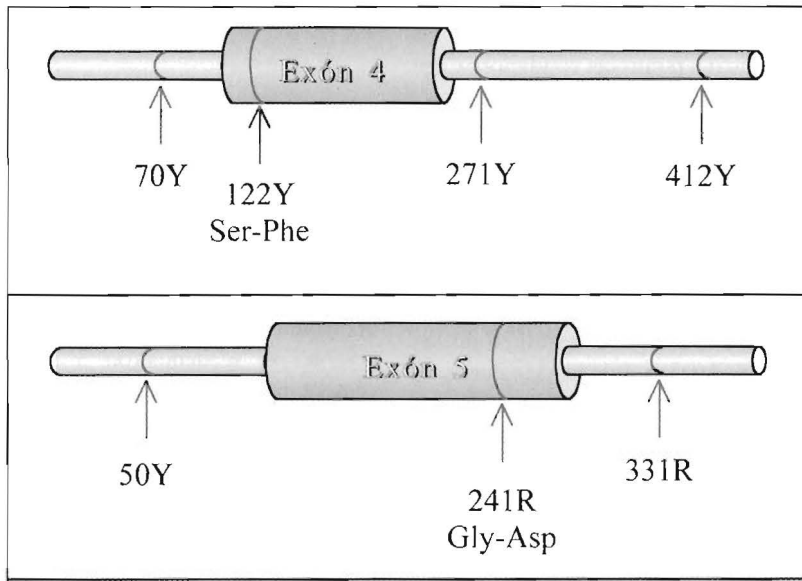
En el fragmento que contiene el exón 3 se obtuvieron 4 patrones electroforéticos distintos por análisis de SSCP. Cada patrón comprende una combinación diferenciada de bandas de cadena simple. Cuando fue posible, se secuenciaron 3 animales que presentaban cada uno de los patrones. De la secuenciación de estos individuos no se pudo extraer ninguna diferencia genotípica clara, a pesar de ser 4 los fenotipos estudiados. Esto no implica que tal diferencia no exista, sino que puede encontrarse en localizaciones en las que la fiabilidad de la secuenciación se reduce, como los extremos de los fragmentos. Si se da tal situación, estas mutaciones no tendrían efecto sobre la

secuencia primaria de la proteína, porque no incidirían sobre el exón 3, que está centrado en la secuencia del fragmento amplificado.

En el fragmento que engloba al exón 4 se encontraron 3 patrones electroforéticos distintos. Tras la secuenciación de los patrones, se obtuvieron 4 polimorfismos de un nucleótido (SNPs). Se localizaron 4 polimorfismos Y (C-T) en las posiciones 70, 122, 271 y 412 de la secuencia consenso. Se localizaron los homocigotos C y T en todas las posiciones, salvo en la 412, en la que únicamente encontramos el homocigoto T. Esta posición está cerca del extremo de la secuencia y en esta región la calidad de los electroferogramas (medida con el programa Phred), desciende notablemente. En cada uno de los patrones secuenciados se encontró más de un genotipo.

Este fenómeno podría explicarse si la técnica de SSCP detectara únicamente las diferencias conformacionales causadas por la modificación de la base de la posición 271, siendo la sensibilidad hacia las demás de muy baja entidad con respecto a esta. De esta manera, en el primer patrón se encontraron los genotipos YYYY y TYYY, en el segundo patrón se encontraron los genotipos CCCY, TCCT y YCCY y en el tercero los genotipos TYTT y TTTT. El polimorfismo Y de la posición 121 se traduce en un cambio de aminoácido Ser, cuando la base es C, a aminoácido Phe, cuando la base es T, en la posición 48 de la secuencia polipeptídica.

En el fragmento que engloba al exón 5 se encontraron 6 patrones electroforéticos distintos. La secuenciación de estos patrones mostró 3 SNPs localizados en las posicio-



Representación esquemática de la localización de los polimorfismos encontrados en los fragmentos 4 y 5.

nes 50, 241 y 331 de la secuencia consenso. En la posición 50 se localiza una variación Y (C-T) de la cual se han encontrado los 2 homozigotos C y T. En la posición 241 se localizó un polimorfismo R (G-A) del cual sólo se ha observado el homocigoto G. En la posición 331 se encontró el heterocigoto R (G-A) del cual sólo se ha observado el homocigoto G. El genotipo para el primer patrón electroforético es CGG. En el segundo patrón electroforético se encontraron los genotipos YRG y TGR. En el tercer patrón el genotipo es YGG, en el cuarto el genotipo es YRG, en el quito el genotipo es YRG y en el sexto el genotipo es CGG. El polimorfismo R de la posición 241 se traduce en un cambio de aminoácido Gly, cuando la base es G, a aminoácido Asp, cuando la base es A, en la posición 130 de la secuencia polipeptídica.

En el fragmento que engloba al exón 6 se diferenciaron 3 patrones de SSCP. La secuenciación de estos patrones sólo mostró un SNP en la posición 294 de la secuencia consenso. Se trata de un polimorfismo Y(T-C) del cual sólo se ha encontrado el homocigoto T. El primer patrón mostró el genotipo T, el segundo patrón mostró el genotipo Y y el tercer patrón mostró el genotipo T.

En el fragmento que contiene el exón 7 se obtuvieron 5 patrones electroforéticos. De la secuenciación de estos patrones se obtuvo un único SNP. En la posición 44 apareció un polimorfismo Y (C-T) del que sólo se ha encontrado el homocigoto T. En el primer patrón se obtuvo el genotipo C, en el segundo el genotipo T, en el tercero el genotipo T, en el cuarto el genotipo Y y en el quito el genotipo T.

De la secuenciación del fragmento que contiene el exón 8 se obtuvieron 6 patrones de SSCP. Tras la secuenciación de estos no se ha encontrado ningún SNP.

Como conclusión, los resultados obtenidos permiten suponer la existencia de variabilidad en la secuencia primaria de la proteína, al menos en 2 puntos, pudiendo, teóricamente, encontrarse estas estructuras proteicas:

	48	130
1	Ser	Gly
2	Ser	Asp
3	Phe	Gly
4	Phe	Asp

El paso siguiente tendrá por objeto buscar la existencia de estos potenciales alelos en una muestra de diferente tamaño de ovejas de la raza Churra para estimar las frecuencias y buscar posibles asociaciones con caracteres productivos.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología, proyecto AGL2002-01413.

Bibliografía

ARRANZ J.J., COPPIETERS W., BERZI P., CAMBISANO N., GRISART B., KARIM L., MARQ F., MOREAU L., MEZER C., RIQUET J., SIMON P., VANMANSHOVEN P., WAGENAAR D., GEORGES M., 1998. A QTL affecting milk yield and composition maps to bovine chromosome 20: A confirmation. Animal Genetics, 29:107-115.

BLOTT S., KIM J., MOISSIO S., SCHMIDT-KÜNTZEL A., CORNET A., BERZI P., CAMBIDANO N., FORD C.,

CRISART B., JHONSON D., KARIM L., SIMON P., SNELL R., SPELMAN R., WONG J., VILKKI J., GEORGES M., FARNIR F., COPPIETERS W., 2003. Molecular dissection of a Quantitative Trait Locus. A Phenylalanine-to-Tyrosine substitution in the transmembrane domain of the bovine Growth Hormone Receptor is associated with a major effect on milk yield and composition. Genetics, 163:253-266.

BRYNE P.F., MCMULLEN M.D., 1996. Defining genes for agricultural traits: QTL análisis and the candidate gene approach. Probe, 7:24-27.

COPPIETERS W., RIQUET J., ARRANZ J.J., CAMBISANO N., GRISART B., MARQ F., MOREAU L., NEZER N., SIMON P., VANMANSHOVEN P., WAGENAAR D., GEORGES M., 1998. A QTL with major effect on milk yield and composition maps to bovine chromosome 14. Mammalian Genome, 9:540-544.

EBSTEIN R.P., NOVICK O., UMANSKY R., 1996. Dopamine D4 (D4DR) exonIII polymorphism associated with the human personality trait of novelty seeking. Nature Genetics, 12:78-80.

EL-ZAREI M.F., 2004. Detección de QTLs implicados en la producción láctea y en la morfología mamaria mediante secuencias microsatélite en el ganado ovino. Tesis doctoral. Universidad de León. España.

GELERNTER J., CROWE R.R., 1997. Candidate genes and psychiatric genetics: tomorrow never knows. Psychiatric Annals, 27:262-267.

GEORGES M., NIELSEN D., MACKINNON M., MISHRA A. *et al.*, 1995. Mapping quantitative trait loci controlling milk production by exploiting progeny testing. Genetics, 139:907-920.

GUTIÉRREZ-GIL B., 2004. Detección de regiones genómicas con influencia sobre caracteres de producción láctea y morfología mamaria en el ganado ovino de raza Churra. Tesis doctoral. Universidad de León. España.

LYNCH M., WALSH B., 1998. Genetics and analysis of quantitative trait. Sinauer associated Inc., Sunderland MA, USA.

SPELMAN R., COPPIETERES W., KARIM L., VAN ARENDONK, J.A.M., BOVENHUIS H., 1996. Quantitative trait loci analysis for five milk production traits on chromosome six in the Dutch Holstein-Friesian population. Genetics, 144:1799-1808.

WALLING G.A., VISSCHER P.M., ANDERSON L., ROTHSCHILD M.F. *et al.*, (2000). Combined analyses of data from quantitative trait loci mapping studies. Chromosome 4 effects on porcine growth and fatness. Genetics, 155:1369-1378.