# Identificación de regiones reguladoras del gen de la miostatina.

**L.J. Royo**[1,2], L. Grobet[2], D.Poncelet[2], D. Pirottin[2], V. Marot[2], B. Brouwers[2], S. Dunner[3], M. Georges[2].

1 Sección de Mejora Genética, CENSYRA-SERIDA-Somió, 33203-Gijón (Asturias); 2 Departament of genetics, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liege (B43), 20 Bd. De Colonster, 4000- Liege, Belgium; 3 Laboratorio de Genética, Dpto. Producción Animal, U.C.M. 28040 Madrid.
E-mail: luisroma@princast.es

## INTRODUCCIÓN

Utilizando la estrategia de clonado de candidatos posicionales se ha identificado una serie alélica de mutaciones en el gen de la miostatina bovina responsables del carácter culón en varias razas bovinas europeas (Grobet y col., 1997; Grobet y col., 1998; Kambadur y col., 1997; McPherron y Lee 1997; Cappuccio y col., 1999). El gen de la miostatina codifica para una proteína que presenta las características típicas de los miembros de la familia de factores de crecimiento TGF-β: un péptido señal, un péptido latente asociado y un dominio carboxiterminal (McPherron y col, 1997).

La miostatina se detecta a una edad temprana en los somitos en desarrollo, y su expresión se mantiene en el animal adulto fundamentalmente en tejido muscular esquelético (McPherron y col, 1997). También se ha detectado la presencia de ARN mensajero en músculo cardiaco y glándula mamaria (Ji y col., 1998). En músculo en fase de regeneración se detecta en las células mononucleadas en la periferia de las fibras musculares.

El objetivo de la presente comunicación es contribuir al conocimiento de los mecanismos que regulan la expresión de la miostatina. Para ello se utilizó un análisis de secuenciación comparativa entre las secuencias bovina y de ratón, y se secuenciaron 17,4 kb. y 15,3 kb. de la secuencia bovina y de ratón a partir de clones de ADN genómico de genotecas comerciales en fago λ.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron dos genotecas bovinas comerciales de ADN genómico (Clontech BL1015j y Stratagene 946702) y una de ratón (Clontech ML1043j) en fago λ para identificar 2 clones bovinos y uno de ratón que completaban la secuencia del ADN codificante más las regiones en 5' y 3' del gen. Los clones fueron identificados por hibridación utilizando como sonda el ADN codificante de la miostatina bovina, obtenido por RT-PCR de ARN mensajero muscular esquelético (Grobet y col., 1997). Los clones se caracterizaron por PCR utilizando oligos específicos de la secuencia de la miostaina y de los brazos del vector de clonado.

Se amplificaron los insertos de los clones elegidos mediante protocolos de *Long-PCR*, y se secuenciaron completamente sus dos hebras. Los productos PCR resultantes se secuenciaron siguiendo una estrategia de *shot-gun* mediante un protocolo de secuenciación cíclica (*Dye terminator Cycle sequencing*) en un secuenciador automático ABI 373. Para completar los huecos de la secuencia se diseñaron oligos y se secuenciaron por mediante una estrategia de *primer-walking*. La posterior unión de los contig de secuencias se llevo a cabo utilizando las

aplicaciones phred/phrap/consed (Ewing y col., 1998; Ewing y Green, 1998; Gordon y col., 1998).

Las secuencias se analizaron usando los programas COMPARE y GAP del grupo de programas GCG.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

**Secuenciación**. Las dos secuencias obtenidas cubrieron la secuencia codificante del gen, los dos intrones que la interrumpen, más secuencias de 5 kb. de media en 5' y 3'. La secuencia de la miostatina bovina consta de 17.417 pb., y la de ratón 15.312 pb.

**Comparación de las secuencias bovina y de ratón.** Las dos secuencias se compararon utilizando una matriz de puntos llevado a cabo con el programa COMPARE. Este programa coloca cada secuencia en un eje, las va comparando por ventanas de 21 nucleótidos y coloca un punto cuando al menos 16 de ellos son iguales (Figura 1).

A partir de la base 1.300 de la miostatina bovina empieza la homología y sigue una línea diagonal. De la posición 12.300 hasta la 15.860 se observa una zona no conservada, la línea de homología continúa hasta el final de la secuencia bovina. La secuencia del ratón se continúa durante unas 2.700 pb. más.

La zona de pérdida de homología representa un proceso de inserción-delección que debió ocurrir durante la divergencia de las dos especies, debe representar una inserción debida a una retrotransposición de un fragmento de 3.560 pb. deducido por la presencia de elementos SINE bovino. El comienzo de la homología coincide con los límites de otro elemento SINE bovino, lo que puede indicar otro fenómeno de inserción. Se eliminaron las secuencias de fuera de la región de homología y se analizaron con el programa GAP, que asigna a las secuencias un porcentaje de homología (Figura 2).

El grado de conservación es alto en las regiones de los exones. A parte de la región codificante, se pueden señalar 4 regiones altamente conservadas, cuya homología está por encima del 80%. Las 4 regiones están señaladas en la Figura 2.

La región 1, situada inmediatamente en 5' del exón1, debe tratarse de la región del promotor. Esto se confirmó posteriormente cuando se identificó en esta región las secuencias correspondientes a una TATA-box y una CAAT-box conservadas en la secuencia bovina y de ratón.

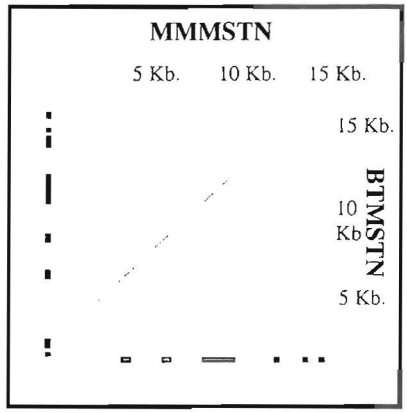
Las regiones 2, 3 localizadas en 5' del gen, y la 4 en el intrón 1, son candidatas a estar implicadas en la regulación de la expresión del gen.

Los módulos reguladores de la expresión muscular están formados por secuencias de unos 200 pb. donde se agrupan varios factores de transcripción músculo específicos. Estos módulos reguladores normalmente se localizan en las regiones 5', intrón 1 y 3' de los genes. La búsqueda de estos factores de transcripción se llevó a cabo usando un algoritmo de regresión logística para la predicción de módulos reguladores músculo-específico. En estos estudios se incluyeron los factores siguientes: Tef, Sp-1, MEF-2, Myf, SRF y MyoD (Wasserman y Fickett, 1998).

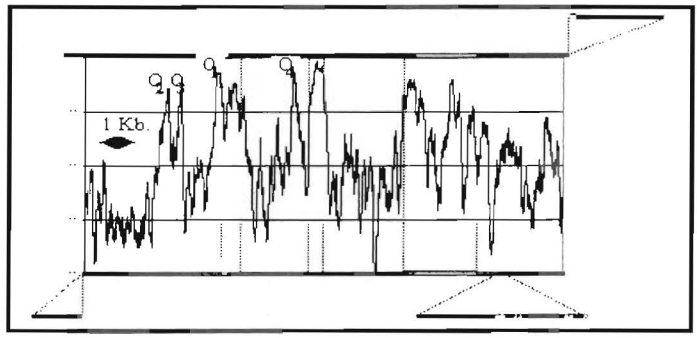
El análisis de regresión logística no identificó ningún factor de transcripción típico muscular. Sin embargo esto no tiene por qué estar en desacuerdo con la conocida expresión muscular de la miostatina. O bien pueden existir en estas regiones factores de transcripción aún no descritos, o bien estos factores de transcripción se encuentran situados en otras zonas no secuenciadas. Las zonas

identificadas deberán ser tenidas en cuenta en el desarrollo de protocolos de modificación de la miostatina, y serán la base para posteriores estudios de funcionalidad.

- Figura 1:




- Figura 2:




## REFERENCIAS BIBILOGRÁFICAS.


- Capuccio I., Marchitelli C., Serracchioli A., Nardone A., Filippini F., Ajmone-Marsan P., Valentini A. (1998). *Animal Genetics*, **29** (suppl. 1): 51.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C., Green, P. (1998). *Genome Research*, **8(3)**:175-185.
- Ewing, B. y Green, P. (1998). *Genome Research*, **8(3)**:186-194.
- Gordon, D., Abajian, C., Green, P. (1998). Genome Research 8(3): 195-202.
- Grobet L., Royo L.J., Poncelet D., Pirottin D., Brouwers B., Riquet J., Schoberlein A., Dunner S., Menissier F., Massabanda J., Fries R., Hanset R., Georges M. (1997). *Nature Genetics*, **17**: 71-74.
- Grobet L., Poncelet D., Royo L.J., Brouwers B., Pirottin D., Michaux C., Menissier F., Zanotti M., Dunner S., Georges M. (1998). *Mammalian Genome*, **9**: 210-213.Kambadur R.,
- Ji S, Losinski RL, Cornelius SG, Frank GR, Willis GM, Gerrard DE, Depreux FF, Spurlock ME. (1998). *Am J Physiol.*, **275**: 265-73.
- McPherron A.C., Lawler A.M., Lee S.-J. (1997). *Nature*, **387**: 83-90.
- McPherron A.C., Lee S.-J. (1997). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 12457-12461.
- Wasserman W.W. y Fickett J.W. (1998). *Journal of Molecular Biology*, **278**: 167-181.