IDENTIFICACIÓN DE LOS DISTINTOS HAPLOTIPOS DEL GEN DE LA MIOSTATINA EN RAZAS BOVINA EUROPEAS

Miranda ME.[1]; Cañón J.[1]; Ménissier F.[2]; Hanset R.[3]; Williams J.[4]; Dunner S. [1]

[1]Laboratorio de Genética. Dpto de Producción Animal. Facultad de Veterinaria. 28040 Madrid. [2]INRA-SGQA, 78352 Jouy-en-Josas. Francia. [3] Association des Eleveurs de la race Blanc-Bleu Belge. 5590 Ciney. Bélgica. [4]Roslin Institute. Roslin. Midlothian. EH25 9PS, Reino Unido.

INTRODUCCIÓN

La hipertrofia muscular bovina es un síndrome que se caracteriza por un elevado desarrollo muscular en detrimento del tejido adiposo y conjuntivo, y en general por un aprovechamiento y una valoración mayor de las canales. La causa genética que originó la aparición de este carácter ha sido determinada recientemente (Mc Pherron y col., 1997; Grobet y col., 1997; Kambadur y col., 1997; Smith y col., 1997) y consiste en la aparición de mutaciones que afectan al gen de la miostatina, en virtud de las cuales la proteina resultante está incapacitada para la realización correcta de sus funciones biológicas.

La miostatina es un factor de crecimiento perteneciente a la familia de los factores de transcripción TGF-β y como todos ellos muestra una secuencia de aminoácidos característica, así como la formación de dímeros mediante puentes disulfuro, estando implicada en fenómenos de desarrollo y diferenciación celular.

Hasta el momento se han encontrado 6 mutaciones que alteran de forma definitiva la estructura de la miostatina, (Grobet y col. 1998; Capuccio y col. 1998) bien mediante la aparición de un codon sin sentido (nonsense) o bien un cambio aminoacídico (missenese) que daña alguno de los puentes disulfuro necesarios para la adquisición de la estructura cuaternaria de la proteína. Asimismo, hay descritos un cierto número de polimorfismos intrónicos y una mutación conservada cuyo efecto sobre la proteína está aun por determinar.

La evaluación de la influencia que ejercen las diferentes mutaciones o polimorfismos del gen de la miostatina sobre el fenotipo es el objetivo de este proyecto (Proyecto Europeo de Demostración BIO4CT98-0421). El primer paso consiste en la descripción del mayor número posible de mutaciones y polimorfismos; para ello rastreamos, mediante la técnica de SSCP (Single Strand Conformation polymorphisms, Orita y col.,1989) que se basa en la migración diferenciada de fragmentos PCR desnaturalizados en función de su secuencia nucleotídica, la secuencia del gen de la miostatina en busca de nuevas mutaciones. Así mismo, con el fin de poder definir haplotipos utilizamos la técnica PASA (PCR Amplification of Specific Alleles, Wu y col.,1989; Sommer y col., 1989), basada en el hecho de que la especificidad de un cebador depende esencialmente de la perfecta complementariedad de bases de su extremo 3' con la secuencia diana. De esta manera ha sido posible definir 20 haplotipos diferentes, que se presentan con frecuencias muy diversas en diferentes razas bovinas europeas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras y extracción de ADN. Se ha procedido a la extracción de ADN mediante el método Watt y Watt (1992) de 670 muestras de sangre de animales pertenecientes a distintas razas bovinas europeas: españolas (Asturiana de Valles y de Montaña, Rubia Gallega, Pirenaica), francesas (Parthenais, Maine-Anjou, Charolais, Limousin, INRA95, Gascon, Bazadais, Blonde d'Aquitaine, Normande, Salers, Aubrac), belga: Blanc Bleu Belge Mixte) y británicas (South Devon, Hereford, Ayrshire, Aderdeen Angus, Beef Shorthorn, Galloway, Devon, Longhorn).

PCR-SSCP. Para identificar las mutaciones presentes en las diferentes razas diseñamos 8 parejas de cebadores que amplifican los 3 exones del gen de la miostatina así como las secuencias intrónicas flanqueantes (Figura 1). Las amplificaciones se agruparon en 4 reacciones PCR-dúplex y se visualizaron en

geles de SSCP (Figura 2). Las condiciones de amplificación y los parámetros de optimización de electroforesis se describieron en (Miranda y col. 1999).

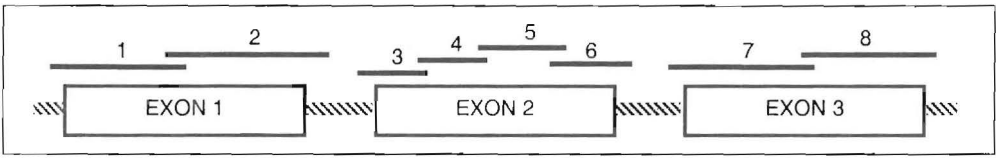


Figura 1. Representación de los 3 exones del gen de la miostatina y la ubicación de los 8 fragmentos PCR que son amplificados en el estudio.

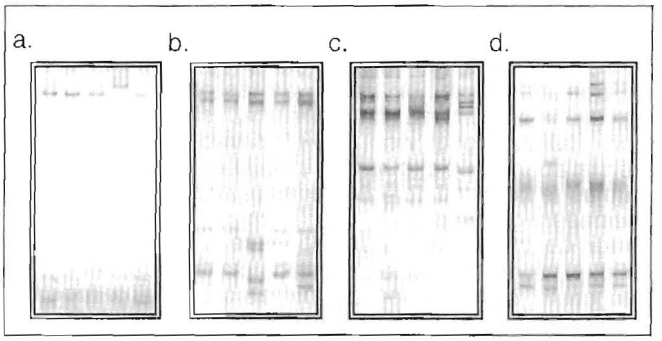


Figura 2. Imagen de las 4 PCR-dúplex en geles de SSCP. En cada uno de ellos y de arriba abajo vemos los siguientes fragmentos PCR con las imágenes propias de los diferentes polimorfismos.
a) Fragmentos 2 y 8.
b) Fragmentos 6 y 3.
c) Fragmentos 5 y 4.
d) Fragmentos 7 y 1.

PASA. Esta técnica la aplicamos en individuos heterozigotos para diversas mutaciones aislando los dos haplotipos que componen su genotipo (Figura 3). Para lograrlo se amplifican en reacciones de PCR cada uno de los haplotipos por separado gracias a la utilización de cebadores alelo-específicos. Los polimorfismos que quedan comprendidos en cada haplotipo se confirman por secuenciación directa en un secuenciador ABI 310 (Applied Biosystems).

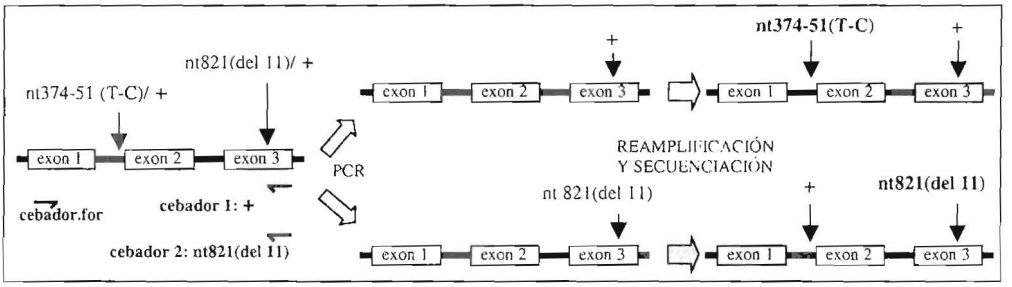


Figura 3. Técnica PASA aplicada a un individuo heterozigoto para dos mutaciones distintas: nt374-51(T-C) y nt821(del 11). Para determinar si ambas mutaciones se encuentran en el mismo o en distinto haplotipo realizamos dos reacciones PCR, ambas con el mismo cebador forward, **cebador.for**, y un cebador reverse diferente en cada una de ellas: uno que solo amplifica el alelo salvaje (+) para la mutación nt821(del 11), **cebador 1**, y otro que solo amplifica el alelo mutado, **cebador 2**. De esta forma se amplifican ambos haplotipos por separado. Para determinar que alelo de la mutación nt374-51(T-C) acompaña a cada uno de los dos haplotipos realizamos una reamplificación sobre el fragmento anterior y secuenciamos el segmento correspondiente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante la aplicación de la técnica PCR-SSCP añadimos a las 12 anteriormente descritas 7 mutaciones nuevas: 2 polimorfismos intrónicos (nt747+7(G-A), nt747+11(A-G)); 3 mutaciones silenciosas (nt267(A-G), nt324(C-T), nt387(G-A)) y 2 mutaciones conservadas (D182N, S105C). Para estas dos últimas aunque no afectan al péptido bioactivo, ya que están localizadas en los exones 1 y 2 respectivamente, no es posible de momento determinar con seguridad su efecto sobre la actividad de este factor de crecimiento.

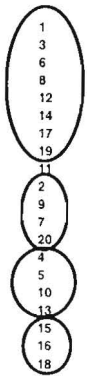


Figura 4. Dendrograma utilizando el algoritmo UPGMA que representa las relaciones existentes entre los diferentes haplotipos descritos.

En la figura 4 puede observarse como se agrupan los diferentes haplotipos en clusters. El haplotipo salvaje (9) aparece junto al 2, que corresponde a la mutación nt821(del11) común a muchas razas europeas, y al haplotipo 7 que es exclusivo de la raza Maine-Anjou. En el cluster superior se incluyen los haplotipos caracterizados por mutaciones que originan un cambio aminoacídico. Los dos clusters situados en la parte inferior de la figura incluyen los haplotipos caracterizados por llevar las mutaciones intrónicas.

En la Tabla 1 resumimos los 20 haplotipos hallados, así como la frecuencia (en %) con que se han hallado en las diferentes razas.

	nt267(A-G)	F94L	S105C	nt324(C-T)	nt374-51(T-C)	nt374-50(G-A)	nt374-16(del 1)	nt387(G-A)	nt414(C-T)	nt419(del7-ins10)	D182N	Q204X	E226X	nt747+7(G-A)	nt747+11(A-G)	nt821(del 11)	E291X	C313Y	Aberdeen Angus	Asturiana de Montaña	Asturiana de Valles	Aubrac	Ayrshire	Blonde d'Aquitaine	Blanc Bleu Belge	Beef Shorthorn	Bazadais	Charolais	Devon	Galloway	Gascon	Hereford	Inra 95	Longhorn	Limousin	Maine-Anjou	Normande	Pathenais	Pirenaica	Rubia Gallega	Salers	South Devon
1		•			*																1	46		4,5				8	30	10			12	30	100			2	44	2		
2															•					10	81	20		1,5	49			1					4,5	20			8	87	25	69		35
3					*														70	40	10	17	40	90	25	100	100	23	40	20	37	40	28	30		27	94		22	16	57	32
4					•	•	•		•										30	46	6	15	50		21			3	20	60	12	45				1				13	34	13
5					•	•	•		•			•												3				61			3		50				0,9					
6					•												•														48											
7													•																				1,1			52	7,2					
8				•	•																							3					1,1			1						
9																				4	2			5								15	1,1					4	2,2	57	13
10					•	•	•		•	•																							1,1			16	0,9	5				
11		•			•											•																										
12			•		•																																	2				
13					•	•	•	•	•														10							10						1				4,8		
14					•						•																						1,1			2						
15	•				•	•	•		•													2																				
16	•				•																			1																		
17				•	•	•	•		•																															2,2		
18					•										•																											7
19					•								•																					10								
20													•			•												10						10								

Tabla 1. Mutaciones del gen de la miostatina ordenadas en los 20 haplotipos encontrados . A la derecha figuran las frecuencias con las que cada haplotipo ha sido hallado en cada una de las razas comprendidas en el estudio.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por CICYT (BIO98-1796), UE (BIO4-CT98-0421)

REFERENCIAS

Capuccio y col. (1998). XXVI Int. Conf. On Animal Genetics. ISAG. Nueva Zelanda.

Grobet y col. (1997). Nature Genetics, 17; 71-74.

Grobet y col. (1998). Mammalian Genome 9: 210:213.

Kambadur y col. (1997). Genome Research 7: 910-915.

Mc Pherron y col. (1997). Nature 387: 83-90.

Miranda y col. (1999). ITEA. Vol. extra Nº 20, tomo I: 288.

Orita y col. (1989). Genomics 5: 874-879.

Smith y col. (1997). Mammalian Genome 8: 742-744.

Sommer y col. (1989). Mayo Clin. Proc. 64: 1361-1372.

Watt y Watt (1992). Molecular Ecology 1: 131-132.

Wu y col. (1989). Proc Natl. Acad. Sci. USA 86: 2757-2760