ESTEAROIL COENZIMA A DESATURASA CAPRINA: SECUENCIA DEL ADNc, ESTRUCTURA DEL GEN Y POLIMORFISMO

M.H. Yahyaoui, A. Sánchez y J.M. Folch
Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Unitat Genètica i Millora, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra

INTRODUCCION

La estearoil coenzima A desaturasa (SCD) es un enzima que interviene en la biosíntesis de los ácidos grasos monoinsaturados, regulando el paso de los ácidos palmítico (16:0) y esteárico (18:0) a palmitoleico (16:1) y oleico (18:1), respectivamente. La desaturación en *cis* tiene lugar entre los átomos de carbono 9 y 10. La actividad del SCD está reflejada no solamente en la composición de los triglicéridos, sino también en la de los fosfolípidos de las membranas celulares. El ratio esteárico:oleico es importante en la fluidez de las membranas y en las interacciones celulares y su alteración está relacionada con varias enfermedades humanas (Ntambi, 1999).

Dos genes homólogos (*SCD1* y *SCD2*) en roedores (Ntambi *et al.* 1988; Kaestener *et al.* 1989; Mihara *et al.* 1990) y un solo gen en ovino (Ward *et al.* 1998) y humano (Zhang *et al.* 1999) han sido clonados y caracterizados. También se han determinado secuencias parciales del ADN copia en bovino y porcino (Nº de acceso GenBank: AF188710 y Z97186). Recientemente, se ha descrito la presencia de un tercer gen en ratón (Parimoo *et al.* 1999). El gen de la *SCD* se expresa en diferentes tejidos, como el adiposo, el hígado, el cerebro, el riñón, la piel y la glándula mamaria en los animales lactantes. En roedores, y en condiciones normales, la expresión del gen *SCD1* tiene lugar en el tejido adiposo, mientras que el gen *SCD2* se expresa principalmente en el cerebro.

En los últimos años, se ha determinado que el consumo de altos niveles de grasas saturadas provoca un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares (Kinsella *et al.* 1990). Por lo tanto, el incremento de los ácidos grasos insaturados en la leche constituye un importante objetivo de selección, debido a que la grasa de la leche es sobretodo saturada. Sin embargo, y debido a las correlaciones genéticas, la selección a favor de este objetivo va en detrimento de otros caracteres de interés productivo (Gibson, 1991; Palmquist *et al.* 1993). Una alternativa es el estudio de genes candidatos implicados en la determinación de este carácter, y en este contexto, el gen que codifica para la SCD constituye un buen candidato. Los objetivos del presente trabajo han sido la caracterización molecular del gen de la SCD (secuencia del ADNc, estructura del gen) en la especie caprina y la detección de polimorfismo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron un total de 99 muestras de ADN genómico pertenecientes a cuatro razas caprinas españolas (Canaria, Malagueña, Murciano-Granadina y

Payoya) y a una raza francesa (Saanen). El ADN se extrajo de muestras de sangre usando protocolos estándar (Ausubel *et al* 1987). El ARN total se aisló de una muestra de glándula mamaria de una cabra Murciano-Granadina usando Trizol, según las indicaciones de la casa comercial (Life Technologies). La reacción de la RT-PCR se hizo en un volumen total de 20 µl durante una hora a 37ºC, conteniendo 1 µg de ARN, 40 pmol de cebador y 200 U de transcriptasa reversa. Durante la RT-PCR se utilizaron dos cebadores, un oligo-dT_{30} y un cebador específico diseñado sobre el exón 5 del gen SCD ovino (Ward *et al.* 1998). En la reacción de PCR dos grupos de cebadores fueron utilizados, E1F y E5R, en la amplificación de la región entre los exones 1 y 5, y E4F y 3NCR, para amplificar los exones del 4 al 6, estando éste último a 22 pb de la cola poliA del ADNc ovino. Las bandas del ADNc fueron aisladas a partir de un gel de agarosa y posteriormente fueron clonadas y secuenciadas en ambas cadenas. Las secuencias fueron analizadas mediante los programas *ClustalV* y *Multialin*.

Para determinar la estructura del gen se amplificaron los intrones utilizando cebadores complementarios a los exones flanqueantes deducidos a partir de la estructura del gen *SCD* bovino (J.F. Medrano, comunicación personal). Las reacciones de PCR fueron realizadas en un volumen total de 50 µl con 100-250 ng de ADN y 2.5 unidades de *Long Expand PCR*. Los fragmentos amplificados fueron purificados y secuenciados. El análisis de los polimorfismos se realizó mediante la amplificación de un fragmento de 447 pb que contiene el exón 5 completo, utilizando cebadores en las regiones intronicas. Los productos de PCR de varios animales de diferentes razas fueron clonados y secuenciados. El genotipado se realizó mediante un protocolo rápido utilizando endonucleasa *Rsa*I, donde 10 µl del producto de PCR fueron digeridos con 10 unidades del enzima a 37ºC durante toda la noche. Los fragmentos de restricción fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 2%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La secuencia del ADNc de la SCD caprina (1906 pb, Nº acceso GenBank: AF339909) contiene una región codificante de 1080 pb (incluyendo el codón de terminación de la traducción) que se traduce en una proteína de 359 aminoácidos, una región 5' no codificante (172 pb) y una región 3' no codificante (654 pb). La comparación de las secuencias de ADNc de la SCD en diferentes especies muestra que las regiones codificantes están bastante conservadas en los rumiantes. Los porcentajes de similitud de estas regiones son del 98% entre caprinos y ovinos, y del 98% entre caprinos y bovinos. El grado de similitud es menor con las especies porcina (89%), humana (87%) y con los roedores (82% tanto para *SCD*1 que *SCD*2). La comparación de las secuencias proteicas muestra que las substituciones están concentradas en la región N terminal de la proteína. Los ocho residuos de histidina esenciales para la actividad catalítica del enzima (Shanklin *et al.* 1994) están conservados.

En ovino, y probablemente en las otras especies de rumiantes, la actividad enzimática de la SCD resulta de la transcripción de un solo gen cuya expresión se muestra principalmente en el tejido adiposo, en el hígado y en la glándula mamaria. A diferencia de lo que ocurre en humano y en ratón, las regiones 3' no codificantes de los ARNm de caprinos y de ovinos son cortas y carecen de las señales de poliadenilación así como de los motivos típicos de desestabilización (AUUUA) de los

mensajeros (Padget *et al.* 1986; Jackson 1993). Estas diferencias podrían estar relacionadas con las características del metabolismo de grasa en rumiantes (alimentos pobres en grasa, biohydrogenación de los ácidos grasos en el rumen).

La estructura del gen de SCD caprino es muy similar a la que presentan roedores y humanos y consiste en 5 exones y 6 intrones de un total de 12 Kb. Toda la región 3' no codificante está contenida en el exón 6. El inicio y final de los intrones presentan la secuencia consenso GT / AT.

Una evidencia preliminar de la existencia de polimorfismos se obtuvo mediante la comparación de secuencias de ADNc y de ADN genómico. Así, se observaron tres sustituciones nucleotídicas, dos en el exón 5 (posiciones 904 y 931) que no generan cambios aminoacídicos en la proteína y una en la región 3' no codificante (posición 1674). La mutación en la posición 931 (G/T) provoca la desaparición de la diana de reconocimiento de la endonucleasa *Rsa*I. Por lo tanto, la digestión del fragmento que contiene el exón 5 (447 pb) del alelo G genera tres fragmentos de 98, 111 y 238 pb, mientras que para el alelo T sólo se generan dos fragmentos de 98 y 349 pb. Se analizaron para este polimorfismo un total de 99 animales: 29 Saanen, 27 Canaria, 24 Murciano-Granadina, 12 Malagueña y 7 Payoya. El polimorfismo no se detectó en las razas Canaria, Payoya y Malagueña, pero el número de animales analizados de éstas dos últimas fue limitado por lo que estos resultados deben considerarse como preliminares. El alelo G se presenta con unas frecuencias del 8 % y del 31 % en las razas Murciano-Granadina y Saanen.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D.,Seidmen, G.G., Smith, J.A. & Struhl K. (Ed.) 1987 Current Protocols in Molecular Biology Green publishing Associates and Wiley-Interscience.

Gibson, J.B. 1991 Journal of Dairy Science 74 3258-3266.

Jackson R.J. (1993) Cell 74, 9-14.

Kaestner, K.H., Ntambi, J.M., Kelly Jr, T.J. & Lane M.D. (1989) Journal of Biological Chemistry 264, 14755-14761.

Kinsella, J.E., Lokesh, B. & Stone R.A. (1990) American Journal of Clinical Nutrition 52, 1-28.

Mihara, K. (1990). Journal of Biochemistry 108, 1022-29.

Ntambi, J.M. (1999) Journal of Lipid Research 40, 1549-58.

Ntambi, J.M., Buhrow, S.A., Kaestner, K.H., Christy, R.J., Sibley, E., Kelly Jr, T.J. & Lane M.D. (1988) Journal of Biological Chemistry 263, 17291-300.

Padgett, R.A., Grabowski, P.J., Konarska, M, Seiler, S. & Sharp P.A. (1986) Annual Reviews of Biochemistry 55, 1119-50.

Palmquist, D.L., Beaulieu, A.A., & Barbano DM. 1993 Journal of Dairy Science 76 1753-1771.

Parimoo, S., Zheng, Y., Eilersten, K., Ge, L., Prouty S., Sundberg, J. & Stenn K. (1999) Journal of Investigative Dermatology Symposium Process 4, 320-22.

Shanklin, J., Whittle, E. & Fox B.G. (1994) Biochemistry 33, 12787-94.

Ward, R.J., Travers, M.T., Richards, S.E., Vernon, R.G., Salter, A.M., Buttery, P.J. & Barber M.C. (1998) Biochimica et Biophysica Acta 1391, 145-56.

Zhang, L., Ge, L., Parimoo, S., Stenn, K. & Prouty S. (1999) Biochemical Journal 340, 255-64.