Estructura del gen de la miostatina bovina.

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.

El gen de la miostatina bovina ha sido propuesto como el gen responsable del carácter culón en varias razas europeas (Grobet y col., 1997; Kambadur y col., 1997; McPherron y Lee 1997). Se han identificado 6 mutaciones en la secuencia codificante de la miostatina en 10 razas europeas (Kambadur y col., 1997; McPherron y ocl., 1997; Grobet y col., 1998; Cappuccio y col., 1999), sin embargo no se ha encontrado ninguna mutación que permita explicar la cularidad en las razas Limusin y Rubia de Aquitania (Grobet y col., 1998). Estos resultados contradicen la tradicional hipótesis de que el carácter culón se habría originado por una mutación en el ganado Shorthorn y a partir de él se habría extendido al resto de razas vacunas europeas (Ménissier, 1982). Ciertas razas muestran una clara homogeneidad respecto a la mutación causante del fenotipo, como pueden ser la Blanco-Azul-Belga o la Asturiana de los Valles, sin embargo en otras existe más de un alelo culón segregando en la población, como en la raza Maine-Anjou.

La identificación de las mutaciones responsables del carácter culón permite, por un lado, diseñar protocolos de diagnóstico para identificar a los animales heterocigotos y llevar a cabo una selección asistida por marcadores; y por otro diseñar estrategias de modificación del gen.

Se han secuenciado 17.417 pb. de la secuencia de la miostatina bovina. El estudio de la secuencia ha permitido identificar los tres exones que forman la secuencia codificante completa, los 2 intrones que la interrumpen, y 5 kb. de cada región flanqueante. Esto permitirá, por una parte, buscar posibles mutaciones fuera de la secuencia codificante que puedan explicar el fenotipo culón en las razas antes indicadas, y aceptar o rechazar la hipótesis de una heterogeneidad de locus en el determinismo genético de la cularidad. Además servirá para caracterizar el gen de la miostatina bovina y sus regiones flanqueantes, siendo el punto de partida para posteriores estrategias de modificación del gen por transgénesis.

La recombinación homóloga es una estrategia utilizada para modificar genes, que permite sustituir una región del genoma por otra región externa modificada según los intereses del trabajo. El éxito de esta técnica depende sobre todo de dos factores: el tamaño del fragmento que se va a intercambiar, y el porcentaje de homología entre los dos fragmentos.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Para secuenciar el gen de la miostatina bovina se analizaron por hibridación dos genotecas de ADN genómico comerciales en fago λ (Clontech BL1015j y Stratagene 946702), utilizando como sonda el ADN codificante de la miostatina bovina obtenido por RT-PCR de ARN total muscular (Grobet y col., 1997). Se identificaron dos clones positivos que juntos daban lugar a una secuencia de tamaño suficiente, para contener el ADN codificante completo más 4-6 kb. en 5' y 3' del gen.

Se caracterizaron los clones mediante PCR utilizando oligos específicos de la secuencia bovina y los brazos del vector de clonado.

Se obtuvieron por *Long-PCR* utilizando un oligo del vector y otro del interior de la secuencia dos fragmentos que permitían tener una secuencia suficientemente larga a cada lado de la secuencia conocida de la miostatina, como para contener las regiones no traducidas del gen y parte de secuencia genómica. Estos fragmentos se secuenciaron utilizando una estrategia combinada de *Shot-gun* y *primer-walking* y se analizaron las secuencias resultantes con las aplicaciones informáticas Phred/Phrap/Consed (Ewing y col., 1998; Ewing y Green, 1998; Gordon y col., 1998).

Los limites de los transcritos se determinaron mediante las técnicas de c-RACE (Maruyama y col., 1995) y RACE-3'(Life Technologies) a partir de ARN extraído a partir de músculo (Chirgwin y col., 1979).

La secuencia completa resultante se utilizó para buscar homologías utilizando el programa BLASTN del paquete GCG.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Para determinar las uniones intrón-exón se alineó la secuencia del ADN codificante bovino con la secuencia obtenida. Los límites de los dos intrones siguen la regla del GT-AG, y en su interior se observaron dos secuencias consenso (YNRAY) situados a una distancia apropiada para determinar el lugar de procesamiento o maduración de los intrones.

El protocolo de c-RACE identificó dos posibles lugares de inicio de la transcripción, situados a 109 pb. y 136 pb. en 5' del codon de inciación ATG, este segundo corresponde al lugar de iniciación identificado por McPherron y col., en la secuencia de ratón. El codon de iniciación no estaba situado en un contexto óptimo, sino en un contexto adecuado GCCACCatgG (Kozak, 1996). Continuando la secuencia en 5' se identificaron una TATA-box y una CAAT-box situadas a distancia compatible con los lugares de iniciación descritos.

Se han identificado 3 posibles lugares de poliadenilación en la zona 3' del gen, situados a 959 pb., 1438 pb. y 1509 pb. a partir del codon stop. Los tamaños de los productos PCR de cada fragmento están en concordancia con las secuencias genómicas, lo que indica que no existen procesos de maduración alternativos dentro del gen. Los tres están precedidos por una secuencia consenso de poliadenilación, situada entre 23 pb., y 17 pb. antes del final del transcrito.

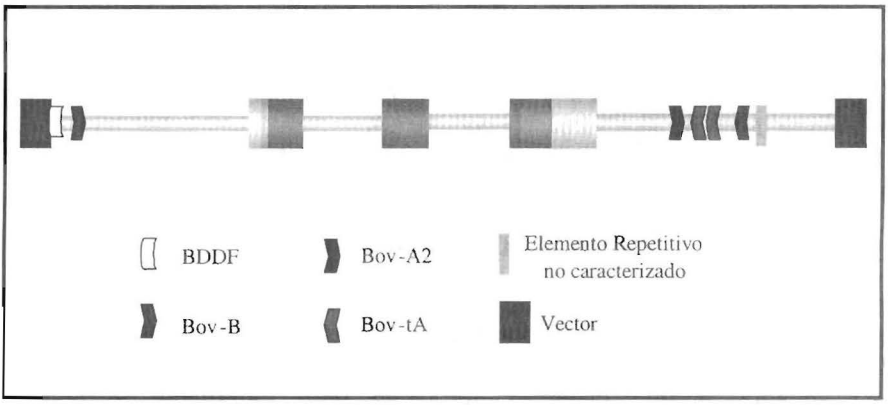
El análisis de la secuencia completa buscando homologías, puso de manifiesto la presencia de varios elementos repetitivos dispersos. Siguiendo la nomenclatura propuesta por Lenstra y col., 1993, se localizaron en la región 5' un SINE Bov-B y un fragmento de un retroelemento BDDF (Szemarj y col., 1995). En la región 3' del gen se localizaron dos SINE Bov-A2 y dos Bov-tA, además de otro elemento repetitivo no caracetrizado (Figura 1).

Se han secuenciado 17.417 pb. de la secuencia de la miostatina bovina y regiones flanqueantes. Dentro de esta secuencia se han determinado, además de la secuencia codificante, las uniones exón-intrón y los posibles límites de los transcritos. Todos los resultados obtenidos están en perfecto acuerdo con el tamaño del ARN mensajero de la miostatina bovina estimado por Kambadur y col., 1997.

Para el desarrollo de proyectos posteriores encaminados a la modificación del gen de la miostatina bovina, resulta imprescindible el conocimiento de una secuencia de suficiente tamaño. De igual modo es importante determinar su secuencia. El

conocimiento de la estructura y de la secuencia de las regiones flanqueantes del gen, será el punto de partida que permitirá el desarrollo de protocolos de modificación de la miostatina bovina.

- Figura 1. Localización y orientación de los elementos repetitivos en la secuencia bovina.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Capuccio I., Marchitelli C., Serracchioli A., Nardone A., Filippini F., Ajmone-Marsan P., Valentini A. (1998). *Animal Genetics*, **29** (suppl. 1): 51.
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J., Rutter, W.J. (1979). *Biochemistry*, **18**: 5294-5299.
- 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.,
- Kozak M. (1996). *Mammalian Genome*, **7**: 563-574.
- Lenstra J.A., van Boxtel J.A.F., Zwaagstra K.A., Schwerin M. (1993). *Genetics*, **24**: 33-39.
- Maruyama I.N., Rakow T.L:, Maruyama H.I.(1995). *Nucleic Acids Research*, **23**: 3796-3797.
- McPherron A.C., Lee S.-J. (1997). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 12457-12461.
- McPherron A.C., Lawler A.M., Lee S.-J. (1997). *Nature*, **387**: 83-90.
- Ménissier F. (1982). *In Current topics in Veterinary Medicine and Animal Science, vol 16: Muscle hypertrophy of genetic origin and its use to improve beef production.* Ed. King and Ménissier, *Curr. Top. Vet. Anim. Sci.*, **16**: 387-428.
- Szemraj J., Plucienniczak G., Jaworski J, Plucienniczak A. (1995). *Gene*, **152**: 261-264.