ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS Y LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA DEL GEN ACIL-COA: DIACILGLICEROL ACILTRANSFERASA 1 (DGAT1) EN PORCINO

Anna Mercadé, Luis Varona*, Armand Sánchez y Josep M. Folch.
Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autónoma de Barcelona.
*Àrea de Producció Animal. Centre UdL-IRTA. 25198 Lleida.

INTRODUCCIÓN

La Acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa (DGAT) es una enzima microsomal que juega un papel importante en el metabolismo de los glicerolípidos, ya que participa en la fase final de la síntesis de triglicéridos usando como substrato diacilglicerol y acilCoA (Cases et al 1998). Al participar en la síntesis de triglicéridos puede intervenir en la absorción de grasas a nivel intestinal, en su almacenamiento en adipocitos, en el metabolismo energético muscular, en la formación de lipoproteinas o en regulación de la concentración plasmática de triglicéridos (Cases et al 1998). La deficiencia de DGAT en ratones produce resistencia a la obesidad pero sin alterar la síntesis de triglicéridos (Smith et al, 2000).

El gen DGAT1 está localizado en el cromosoma humano 8qter (Goureau et al, 1996), siendo esta región homóloga a la región del cromosoma 4 porcino donde se ha detectado un QTL que afecta al metabolismo de ácidos grasos. (Pérez-Enciso et al 2000). La posición de este QTL coincide con la descrita anteriormente por otros autores (Andersson et al, 1994; Wang et al,1998; Walling et al, 1998; Marklund et al, 1999). Un trabajo anterior de nuestro grupo en el que se analizó la composición de ácidos grasos en la F_2 de un cruzamiento entre Ibérico y Landrace, reveló la existencia de un QTL con efectos sobre el porcentaje de ácido linoleico y oleico en esta posición cromosómica. El genotipo Ibérico para el QTL está asociado a un menor porcentaje de linoleico y a un mayor porcentaje de oleico respecto al genotipo Landrace. (Pérez-Enciso,et al 2000).

El objetivo del presente estudio era describir polimorfismos del gen DGAT1 en diferentes razas porcinas y establecer su localización cromosómica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Amplificación del gen DGAT1 por RT-PCR: El ARN total se aisló de muestras de hígado pertenecientes a animales de las razas Ibérico, Landrace, Pietrain, Large White y Meisham usando Trizol (Life Technologies). La transcripción reversa se realizó con 1μg de ARN, 0.5 μM de *primer* (R7 o R16) y 15 U de *ThermoScript™ RT* en un volumen total de 20 μl ((Life Technologies). Para la reacción de PCR se usaron dos pares de *primers* el F1-R6 y el F5-R16 (Tabla 1). Las condiciones fueron 1.5 mM $MgCl_2$, 200 μM dNTPs, 300 nM de cada *primer*, 2.6 U *Expand High Fidelity PCR* (Roche Molecular Biochemicals) en un volumen final de 50 μl. El perfil térmico utilizado consistía en una desnaturalización previa a 95°C durante 3 min. Seguido de 95°C 30 s, 60°C 1 min y 72°C 2.5 min durante 10 ciclos. 95°C 30 s, 60°C 1 min y 72°C 2.5 min durante 25 ciclos (aumentando 20 s la extensión en cada ciclo). Finalmente una extensión a 72 °C durante 10 min. El diseño de los *primers* se realizó a partir de la secuencia del ARNm porcino (número de acceso Genbank AY093657).

Tabla 1. Lista de los *primers* usados para la RT-PCR y secuenciación.

Primer	5' → 3'
DGAT-F1	GGCAGGGTGCAGGCAGAGGC
DGAT-F5	CCACCATCCTCTGCTTCCCAG
DGAT-F10	GTCCCCACCATCCAGAACTCC
DGAT-R6	GCTCTCGGCACCACAGGTTG
DGAT-R7	AGGTTGTCGGGGTAGCTCACGC
DGAT-R11	CGATGATGCGTGAGTAGTCCATG
DGAT-R16	GCCGTGGACAAGCACTTTATTG

Secuenciación del producto amplificado: Los fragmentos amplificados fueron purificados con *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN) y posteriormente secuenciados mediante el *BigDye™ Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) usando los *primers* F1, F5, F10, R6, R11 y R16. Las reacciones de secuenciación fueron analizadas en un aparato de electroforesis capilar ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems). La comparación de las secuencias se realizó mediante el *software SeqScape™ v1.1* (Applied Biosystems)

Localización cromosómica del gen: El mapeo del gen DGAT1 se realizó a partir del panel de células somáticas híbridas irradiadas *INRA-Minnesota Porcine Radiation Hybrid* (ImpRH) (Milan et al 2000). Para poder diferenciar el DGAT1 porcino del de hámster se usaron los primer DGAT-F10 y R11 que únicamente amplifican en cerdo. La PCR contenía 1.5 mM de $MgCl_2$, 0.5 µM de *primers* y 25 ng de ADN en un volumen final de 25 µl. El perfil térmico empleado consistía en una desnaturalización de 95 °C 3 min. 95 °C 1 min, 64 °C 1 min, 72 °C 2.5 min durante 35 ciclos y finalmente 72 °C 7 min. El fragmento amplificado tenía un tamaño de 137 pb y fue visualizado en un gel de agarosa al 2.5%. Los resultados fueron analizados por *IMpRH mapping tool* (http://imprh.toulouse.inra.fr) (Milan et al 2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por RT-PCR se obtuvieron dos fragmentos solapados de 660 pb y de 1200 pb utilizando los pares de *primers* el F1-R6 y F5-R16 respectivamente.

Los fragmentos obtenidos fueron secuenciados con los *primers* F1 y R6 para el primero y con los *primers* F5, F10, R11 y R16 para el segundo. Se obtuvo una secuencia final de 1650 pb, que contiene toda la región codificante y 8 pb y 200 pb de las regiones 5' y 3' no codificantes del ARNm respectivamente (*Genbank* AY093657).

La secuenciación del ARNm del gen DGAT1 en Ibérico, Landrace, Large White, Pietrain y Meisham permitió identificar varios polimorfismos en estas razas.
En Pietrain se detectó un polimorfismo en la región 3' no codificantes (posición 1676 de la numeración correspondiente a la secuencia *Genbank* AY093657) que determina cambio aminoacídico prolina/leucina. También se encontraron dos polimorfismos silenciosos en la región codificante (posición 1230 y 933 de la numeración correspondiente a la secuencia *Genbank* AY093657). Estos dos últimos polimorfismos coinciden con los descritos por Nonneman y Rohrer (2002).

En Meisham se encontró en la posición 1676 el polimorfismo que determina un cambio aminoacídico prolina/leucina y otros tres polimorfismos silenciosos en las posiciones 933, 978 y 1230.
En Landrace se detectó en la posición 1230 un polimorfismo silencioso.

Tabla 2. Polimorfismos encontrados en el ARNm del DGAT1 de las diferentes razas.

Localización	Posición*	Secuencia flanqueante
Exón 8	933	Meisham: tacccSgacaa Pietrain: tacccSgacaa
Exón 9	978	Meisham: gccccRactct
Exón 13	1230	Meisham: ttccaYtcctg Pietrain: ttccaYtcctg Landrace: ttccaYcctg
Exón 17	1676	Meisham: cgctc**Y**gggct Pietrain: cgctc**Y**gggct

*Posición respecto ARNm porcino (*Genbank* AY093657)

La utilización del panel de células somáticas híbridas irradiadas *INRA-Minnesota Porcine Radiation Hybrid* (ImpRH) permitió localizar el gen DGAT1 a 47 centiRay (cR) del marcador microsatélite SW2404 con un LOD = 9, por lo tanto, se sitúa casi al extremo del brazo p del cromosoma 4. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Nonneman y Rohrer (2002) por análisis de ligamiento, siendo el gen DGAT1 el gen mapeado más próximo al telómero.

La localización obtenida para el gen DGAT1 porcino no es la esperada por el análisis de los mapas comparativos entre el genoma humano y el porcino, y se sitúa fuera del intervalo de confianza del QTL encontrado en Ibérico.

BIBLIOGRAFÍA

-Cases,S., Smith,S.J., Zheng,Y., Myers,H.M., Lear,S.R., Sande,E., Novak,S., Collins,C., Welch,C.B., Lusis,A.J., Erickson,S.K., 1998, Proceedings of National Academy of Sciences of the USA, 95 13018-23
-Goureau, A., Yerle,M., Schmitz, A., Riquet,J., Milan,D., Pinton,P., Frelat, y G.,Gellin, J., 1996, Genomics, 36: 252-62.
-Milan,D., Hawken,R., Cabau,C., Leroux,S., Genet,C., Lahbib,Y., Tosser,G., Robic, A., Hatey,F., Alexander,L., Beattie,C., Schook,L., Yerle,M. y Gellin,J., 2000, Bioinformatics, 16: 558-59.
-Nonneman,D.y Rohrer, G.A., 2002, Animal Genetics 33: 468-85.
-Pérez-Enciso,M., Clop,A., Noguera,J.L., Óvilo,C., Coll,A., Folch, J.M., Babot,D., Estany,J., Oliver, M.A., Díaz,I. Y Sánchez,A., 2000, Journal of Animal Science, 78: 2525-31.
-Smith,S.J., Cases,S., Jensen,D.R., Chen,H.C., Sande,E., Tow,B., Sanan,D.A., Raber,J., Eckel,R.H.,y Farese Jr,R.V., 2000, Nature genetics, 25:87-90.

AGRADECIMIENTOS: Proyecto financiado por CICYT (AGF99-0284-C02-02) y beca predoctoral FI.