CARACTERIZACIÓN DE GENES CLAVE EN EL METABOLISMO DE LA GRASA EN RUMIANTES: Aislamiento, localización y búsqueda de variación

R. Roy [a], L. Ordovas [a], M. Gautier [b], H. Hayes [b], P. Zaragoza [a], A. Eggen [b], & C. Rodellar [a]

[a]Laboratorio de Genética Bioquímica y Grupos Sanguíneos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España.
[b]Laboratoire de Génétique Biochimique et Cytogénétique, INRA, Jouy-en-Josas, France

INTRODUCCIÓN

Caracteres como el marmoreado, la cantidad de grasa de la leche o la carne, composicion ., además de estar influenciados por factores externos como la dieta, tienen un componente genético, y suelen estar determinadas por un número elevado de genes. Se han detectado distintas regiones cromosómicas en bovino con influencia sobre este tipo de caracteres cuantitativos o QTLs. Hasta ahora ha resultado complicado asociar genes a estas variaciones observadas debido al escaso número de genes localizados en los mapas de especies domésticas. Actualmente con el uso de información procedente de mapas más desarrollados, como el de la especie humana y el de ratón, las librerías de cDNA, y el uso de paneles de células híbridas irradiadas se han incorporado un mayor número de genes en los diferentes mapas (Georges and Anderson, 1996). Para la localización fina de estos caracteres cuantitativos es necesaria la incorporación de genes candidatos y marcadores polimórficos asociados a los mismos.

En este trabajo presentamos un mapa de células híbridas irradiadas de las regiones donde se localizan tres enzimas que intervienen en la síntesis de grasa y que por su función y su localización cromosómica son posibles genes candidatos con influencia en algunos QTLs descritos en la especie bovina. La FASN (Fatty Acid Synthase) que interviene en la síntesis de ácidos grasos, cataliza todas las reacciones para la conversión de acetil-CoA y malonil-CoA en ácido palmítico. Esta enzima ha sido localizada mediante FISH en el cromosoma bovino 19q22 (Roy et al., 2001) La GPAM (Glycerol Phosphate Acyltransferase) que interviene en la primera etapa de la síntesis de triglicéridos y que ha sido localizada en el cromosoma BTA26q22 (Roy et al., 2002) . La MGAM (Maltase Glucoamylase) que hidroliza los extremos no reductores de los oligosacáridos y ha sido localizada en el cromosoma bovino BTA4q34 (Roy et al., in press). Además de llevar a cabo su localización cromosómica hemos realizado la búsqueda de variación tanto en la zona codante como en la no codante, tratasndo de encontrar marcadores microsatélites y SNPs asociados a los tres genes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamiento de fragmentos específicos bovinos para cada uno de los genes.

Se diseñaron oligonucleótidos a partir de secuencias disponibles en otras especies. Para el gen de la FASN se utilizó la secuencia de rata (M84761), para la GPAM se utilizó una secuencia de ratón (NW_000148) y para la MGAM una secuencia de la MGAM humana (NM_004668). Los primers utilizados, las condiciones de amplificación y la talla de los fragmentos obtenidos se muestran en la Tabla 1. Estos fragmentos específicos fueron clonados y secuenciados. La búsqueda de homología se llevo a cabo con el programa BLAST del NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Las secuencias bovinas fueron enviadas a GenBank.

GEN	Oligos 5'- 3'	Tª unión	Talla fragmento	Nº acceso a GenBank	BAC positivos
FASN	ATCTTCTTGAAGAACGTGAC CATGTATCGGAAGGCGTCCT	55ºC	180 pb	AF285607	0439G6,0663B4 0073H8,0311H9 0322G1,0878E7
GPAM	AGCACCAGCAATTCATCACC TTCTGCAGGTACTCAGACTC	53ºC	120 pb	AF469047	0522B11 0789H09
MGAM	AGGGACAGGGGCCTGAGCAG TCGTATGTGGGTCTGGTCTGG	55ºC	129pb	AY188356	0022G4

Tabla1. Oligonucleótidos y características de amplificación de cada uno de los genes.

Screening de una librería de BACs (Bacterial Artificial Chromosomes).

Los primers mostrados en la Tabla 1 fueron utilizados para la búsqueda de clones que contuvieran los genes objeto de nuestro estudio en una librería de BACs (Eggen et al., 2001).

FISH: Hibridación in situ fluorescente.

La hibridación in situ fluorescente se llevó a cabo sobre preparaciones de cromosomas bovinos (Hayes et al., 2000). Se utilizaron como sonda los BACs positivos para el gen de la FASN, de la GPAM y de la MGAM.

Análisis de un panel de células híbridas irradiadas.

Este análisis se llevo acabo usando un panel de 94 clones híbridos irradiados de hámster y bovino de 3000 Rads (Williams et al., 2002). Se utilizó el programa Carthagene para realizar el análisis two-point y multipoint de los datos obtenidos mediante PCR del panel de híbridas irradiadas y construir el mapa de la región que contiene cada uno de los tres genes. Las distancias entre los marcadores se calcularon con el programa RHMAP 3.0 (Lange et al., 1995).

Búsqueda de polimorfismos: microsatélites y SNPs (single nucleotide polymorphism)

Se buscaron marcadores microsatélites a partir de los BACs aislados para cada uno de los genes mediante digestión de los mismos con SAUIII y posterior ligación con un vector de clonación. Una vez ligados se transformaron bacterias y tras la hibridación con una sonda $(TG/TC)_{12}$ se secuenciaron los clones positivos.

Se buscaron SNPs en distintos exones de la FASN bovina (Roy et al., in preparation) mediante secuenciación directa del cDNA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Localización cromosómica de los genes de interés

En la Figura 1 se muestra la localización citogenética y el mapa de híbridas irradiadas de la región donde se han localizado cada uno de los genes. Diferentes estudios han mostrado posibles QTL en el cromosoma BTA19, BTA26 y BTA4(Taylor et al., 1998; Zhang et al., 1998; Boichard et al., 2000;). La FASN, la GPAM y la MGAM bovinas podrían ser posibles genes candidatos para estos QTLs observados por su localización y su función.

Detección de variación asociada a los genes de la FASN, GPAM y MGAM.

Los BACs positivos para cada fragmento se utilizaron para la búsqueda de microsatélites. Se obtuvieron varias secuencias microsatélites, de las cuales 5 resultaron ser polimórficas. Una de ellas estaba asociada al gen de la FASN y cuatro al gen de la GPAM.

Para la búsqueda de SNPs se partió de parte de la secuencia obtenida para la GPAM y FASN en la especie bovina (Roy et al., en preparación) y se amplificaron distintas regiones exónicas en distintos animales. Mediante secuenciación directa de los fragmentos PCR hemos detectado dos SNPs, uno en el exón 34 y otro en el exón 21 del gen de la FASN.

Estos polimorfismos, microsatélites y SNPs, van a ser estudiados en distintas razas bovinas, con diferente grado de engrasamiento, para tratar de relacionar las distintas variantes alélicas asociadas a estos genes con la cantidad de grasa.

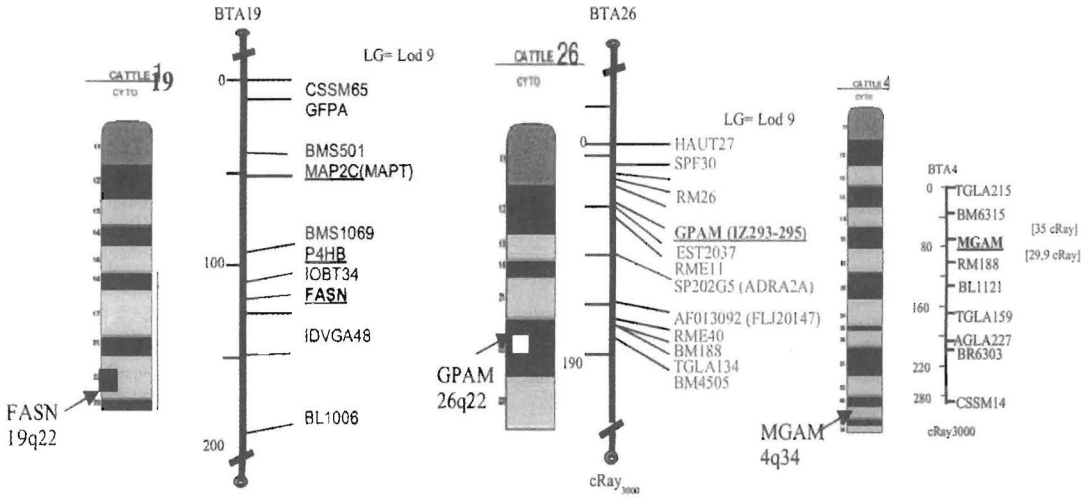


Figura 1. Mapas RH (radiation hybrid) para las regiones del cromosoma BTA19, BTA26 y BTA4 donde se localizan el gen de la FASN, la GPAM y la MGAM respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA

-Eggen A, Gautier M, Billaut A, Petit E, Hayes H, Laurent P, Urban C, Pfister-Genskow M, Eilertsen K, and Bishop MD, 2001. Construction and characterization of a bovine BAC library with four genome-equivalent coverage. Genet Sel Evol 33(5): 543

-Georges M, Andersson L, 1996. Livestock genomics comes of age. Genome Res 6(10):907-921

-Hayes H, Di Meo GP, Gautier M, Laurent P, Eggen A, Ianuzzi L, 2000. Localization by FISH of 31 Texas nomenclature type I markers to both Q and R banded bovine chromosomes Cytogenet Cell genet 90:315-320

-Lange K, Boehnke M, Cox DR, Lunetta KL, 1995 Statistical methods for polyploid radiation hybrid mapping. Genome Res 5(2):136-150

-Roy R, Gautier M, Hayes H, Laurent P, Osta R, Zaragoza P, Eggen A, and Rodellar C, 2001. Assignment of the fatty acid synthase (FASN) gene to bovine chromosome 19 (19q22) by in situ hybridization and confirmation by somatic cell hybrid mapping. Cytogenet Cell Genet 93(1-2): 141-142.

-Roy R, Gautier M, Hayes H, Laurent P, Zaragoza P, Eggen A, and Rodellar, C, 2002. Assignment of the glycerol-3-phosphate aciltransferase mitochodrial (GPAM) gene to bovine chromosome 26 (26q22) by in situ hybridization and confirmation by somatic cell hybrid mapping. Cytogenet Genome Res 97:276-277

-Roy R, Gautier M, Hayes H, Laurent P, Zaragoza P, Eggen A, and Rodellar, C,. Assignment of the maltase glucoamylase (MGAM) gene to bovine chromosome 4 (4q34) by in situ hybridization and confirmation by radiation hybrid mapping. Cytogenet Genome Res, in press

-Schiex T, Chabrier P, and M, Milan D, 2002.Boosting EM for radiation hybrid and genetic mapping.Theor Appl Genet,in press

-Taylor JF, Coutinho LL, Herring KL, Gallagher DS, Brenneman RA, Burney N, Sanders JO, Turner JW, Smith SB, Miller RK, Savell JW, and Davis SK, 1998. Candidate gene analysis of GH1 for effects on growth and carcass composition of cattle. Anim Genet 29(3): 194-201.

-Williams JL, Eggen A, Ferreti L, Farr C, Gautier M, et al,. 2002. A bovine whole genome radiation hybrid panel and outline map. Mamm Genome 13:469-474

-Zhang Q, Boichard D, Hoeschele I, Ernst C, Eggen A, Murkve B, Witte LA, Grignola FE, Uimari P, Thaller G, and Bishop MD, 1998. Mapping quantitative trait loci for milk production and health of dairy cattle in a large outbred pedigree. Genetics 149(4): 1959-1973.