SECUENCIA NUCLEOTÍDICA Y POLIMORFISMO DEL GEN DE LA 2,4-DIENOIL-COA REDUCTASA (*DECR*) PORCINA

Marcel Amills[1], Oriol Vidal[1], Luis Varona[2], Anna Tomàs[1], Armand Sànchez[1]

[1] Unitat de Ciència Animal, Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Bellaterra 08193.
[2] Area de Producció Animal, Centre UdL-IRTA, Lleida 25198.

INTRODUCCIÓN

El enzima 2,4-dienoil-CoA reductasa (DECR) participa en el proceso de β-oxidación de los ácidos grasos polinsaturados catalizando la reducción dependiente de NADPH del *trans*-2-*cis*-4-dienoil CoA en 3-enoil-CoA, que posteriormente es convertido en *trans*-2-enoil-CoA por la Δ^3-Δ^2–enoil-CoA-isomerasa (Kunau y Dommes 1978). La DECR es un homotetrámero constituido por subunidades de 30 kDa que ejerce su función a nivel mitocondrial y que se expresa en diversos tejidos como riñón, hígado, corazón y páncreas (Koivuranta et al. 1994). En humano, el gen *DECR* ha sido secuenciado completamente y mapeado en el cromosoma 8q21.3 (Helander et al. 1997). En un trabajo previo, nuestro grupo mapeó el gen *DECR* porcino cerca del centrómero del cromosoma 4 e identificó un polimorfismo G/C en el exón 2 (Clop et al. 2002). El objetivo principal del presente trabajo ha consistido en secuenciar el cDNA del gen *DECR* porcino con la finalidad de hallar nuevos polimorfismos que puedan ser de interés en la realización de estudios de asociación con caracteres productivos.

MATERIAL Y METODOS

Amplificación del cDNA DECR porcino: Se realizaron extracciones de RNA a partir de muestras de hígado correspondientes a 10 individuos de las razas Pietrain, Large White, Landrace, Vietnamita e Ibérica. Las muestras de tejidos se congelaron en nitrógeno líquido, fueron pulverizadas con un mortero y homogenizadas. Posteriormente, el RNA total se purificó mediante el preparado *Trizol reagent* (Gibco BRL, Life Technologies). La síntesis de cDNA se llevó a cabo mediante el kit *ThermoScript RT-PCR System kit* (Invitrogen S.A.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los oligonucleótidos empleados en la reacción de amplificación fueron ENOIL-EXO2-5; 5'- AGT TTT TCA GTT ATG GGA CAA AAA-3', DECR-3-CDNA; 5'-GAA CCT TTT GTC TTC CTG ATG AG-3'. Las condiciones de la reacción de PCR fueron 1.5 mM $MgCl_2$, 100 μM dNTPs, 0.5 μM de cada *primer*, 2-3 μl de reacción de transcripción reversa y 1.25 U de Taq DNA polimerasa (Ecogen) en un volumen final de 20 μl. El perfil térmico fue de 94 ºC-1 min, 63 ºC-2 min, 72 ºC-3 min durante 35 ciclos.

Secuenciación del producto amplificado: El producto amplificado se secuenció mediante el *kit* de secuenciacion *ABI PRISM Cycle sequencing kit* (Perkin Elmer Biosystems). Las reacciones de secuenciación fueron analizadas en un aparato de electroforesis capilar *ABI PRISM 310* (Perkin Elmer Biosystems). Para secuenciar el cDNA *DECR* se emplearon los primers

ENOIL-EXO2-5, DECR-3-CDNA, ENOIL-EX3-3; 5'-ATT AGG ATG TCC TGC AAC TTT GAT C-3' y DECR-FW-EX5; 5'-GTG ATA AAC AAT GCA GCA GG-3'.

Genotipado del polimorfismo G/C del exón 2: El exón 2 del gen DECR se amplificó mediante los oligonucleótidos ENOIL-EXO2-5 y ENOIL-EXO2-3; 5'-CAC TGA GCA CCT AGG CTG GA-3'. La composición de la PCR fue 1.5 mM $MgCl_2$, 100 µM dNTP, 0.5 µM de cada oligonucleótido, 30 ng de DNA genómico y 0.5 U de Taq DNA polimerasa en un volumen final de 25 µl. El perfil térmico consistió en 1 ciclo a 94 °C-1.5 min, 35 ciclos a 94 °C-1.5 min, 58 °C-2 min y 72 °C-2.5 min y un ciclo final de extensión a 72 °C-20 min. El producto amplificado fue purificado mediante el kit *ExoSAP-IT kit* (Amersham Biosciences Europe GmbH) y la mutación fue genotipada mediante el kit *SnaPshot™ ddNTP Primer Extension kit* (Applied Biosystems). La secuencia del oligonucleótido usado en la reacción de extensión fue: SNAP2-DECR; 5'– CCA CCA AAT ACT TTT CAA GGA AAA–3'.

Genotipado del polimorfismo G/C del exón 5: La secuencia de los oligonucleótidos empleados para amplificar el exón 5 fueron DECR-FW-EX5 y DECR-REV-EX5; 5'-CTT TCT GTG CTT TAA TTA GTT GC-3'. La composición de la PCR fue 1.5 mM $MgCl_2$, 100 µM dNTP, 0.5 µM de cada oligonucleótido, 60 ng de DNA genómico y 0.75 U de Taq DNA polimerasa en un volumen final de 30 µl. El perfil térmico consistió en 30 ciclos a 94 °C-1 min, 61 °C-1 min y 72 °C-1 min. El producto amplificado fue purificado y genotipado de la forma anteriormente descrita. La secuencia del oligonucleótido usado en la reacción de extensión fue: SNAP5-DECR; 5'–CAT TAG GAG AGA GTC TTT CA–3'. Las frecuencias alélicas de este polimorfismo se analizaron en una muestra de 48 cerdos pertenecientes a las razas Meishan (n = 10), Large White (n = 9), Pietrain (n = 10), Ibérico (n = 10) y cerdo Canario (n = 9).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se amplificó un fragmento de 937 pb correspondiente a la mayor parte del cDNA del gen *DECR* porcino mediante dos oligonucleótidos situados en los exones 2 y 10. Dicho fragmento fue secuenciado en ambas direcciones en diez individuos de distintas razas porcinas. El alineamiento de dichas secuencias mediante el programa Multalin (Corpet et al. 1988) permitió obtener una secuencia consenso (número de acceso Genbank = AY233130) que fue comparada mediante el programa Blastn con las secuencias de genes ortólogos en otras especies. La secuencia parcial del cDNA *DECR* porcino presentó una similitud nucleotídica del 89% y 83% con sus ortólogos humano y murino, respectivamente. El alineamiento de las distintas secuencias permitió confirmar la existencia de un polimorfismo G/C en el exón 2 previamente descrito por Clop et al. (2002). Dicho polimorfismo está asociado a una sustitución aminoacídica Val/Leu en la posición 61. Asimismo, se identificó un segundo polimorfismo G/C en el exón 5 asociado a una sustitución Ser/Thr en la posición 153. Se observó la existencia de dos haplotipos G (exón 2) – G (exón 5) y C (exón 2) – C (exón 5).

La localización cromosómica del gen *DECR* porcino coincide con la de un QTL para espesor del tocino dorsal y porcentaje de ácido oleico y linoleico descrito previamente por Pérez Enciso et al. (2000). Esta característica unida al hecho de que el enzima *DECR* juega un papel crucial en la β-oxidación de

ácidos grasos polinsaturados evidencia el interés de determinar si existen asociaciones entre alguno de los polimorfismos observados y caracteres relacionados con la deposición grasa. Con dicha finalidad, se han optimizado métodos de genotipado para ambas mutaciones basados en la técnica de *primer-extension analysis*. Mediante esta técnica, se han determinado las frecuencias alélicas del polimorfismo del exón 2 (Clop et al. 2002) y del exón 5 (ver Tabla 1) y se está llevando a cabo el genotipado de una población Landrace de 546 individuos para los que se dispone de medidas de calidad de la canal y de la carne.

Tabla 1. Frecuencias alélicas del polimorfismo G (Ser_{153}) / C (Thr_{153}) en el exón 5 del gen *DECR*.

Raza	N	Ser_{153}	Thr_{153}
Large White	9	0.50	0.50
Pietrain	10	0.70	0.30
Meishan	10	1.00	0.00
Ibérico	10	0.85	0.15
Landrace	73	0.73	0.27
Cerdo canario	9	0.94	0.06

AGRADECIMIENTOS

Gracias a J. Capote, CIA "El Dehesón del Encinar", COPAGA y Nova Genètica por ceder las muestras de sangre y tejidos utilizadas en este estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Clop, A., A. Cercós, A. Tomás, M. Pérez-Enciso, L. Varona, J.L. Noguera, A. Sánchez, M. Amills. 2002. Assignment of the 2,4-dienoyl-CoA reductase (DECR) gene to porcine chromosome 4. Anim Genet. 33: 164-5.

Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucleic Acids Res. 16: 10881-90.

Helander, H. M., K.T. Koivuranta, N. Horelli-Koitunen, J.J. Palvimo, A. Palotie, y J.K. Hiltunen. 1997. Molecular cloning and characterization of the human mitochondrial 2,4-dienoyl-CoA reductase gene (DECR). Genomics 46: 112-119.

Koivuranta, K.T., E.H. Hakkola, y J.K. Hiltunen. 1994. Isolation and characterization of cDNA for human 120 kDa mitochondrial 2,4-dienoyl-coenzyme A reductase. Biochem J. 304:787-92.

Kunau, W.H., y P. Dommes. 1978. Degradation of unsaturated fatty acids.Identification of intermediates in the degradation of cis-4-decenoyl-CoA by extracts of beef liver mitochondria. Eur. J. Biochem. 91: 533-544.

Pérez-Enciso, M., A. Clop, J.L Noguera, C. Ovilo, A. Coll, J.M. Folch, D. Babot, J. Estany, M.A. Oliver, I. Díaz y A. Sanchez. 2000. A QTL on pig chromosome 4 affects fatty acid metabolism: evidence from an Iberian by Landrace intercross. J Anim Sci. 78: 2525-31.