CARACTERIZACIÓN DEL GEN DEL RECEPTOR DE LA PROLACTINA (*PRLR*) PORCINO

Anna Tomás[1], Marcel Amills[1], José Luís Noguera[2] y Armand Sánchez[1]

[1]Unitat de Genètica i Millora Animals, Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Facultat de Veterinària, UAB. Bellaterra 08193, Spain
[2]Àrea de Producció Animal, Centre UdL-IRTA, Lleida 25198, Spain

INTRODUCCIÓN

El receptor de la prolactina (*PRLR*) es un miembro de la superfamilia de los receptores de la hormona de crecimiento/prolactina/citoquina clase 1. La unión de la prolactina al *PRLR* desencadena la activación en cascada de múltiples mediadores --JAKS quinasas y proteínas STATs- (Bole-Feysot *et al.*, 1998) que, en última instancia, activan la transcripción de proteínas lactogénicas e incrementan la expresión de receptores de progesterona en útero y ovario. El gen *PRLR* humano está constituido por 11 exones presentando splicing alternativo del primer exón debido a la existencia de dos promotores alternativos tejido-específicos. El codón de iniciación de la traducción está situado en el exón 3. Se han descrito múltiples isoformas del *PRLR,* generadas por un mecanismo de splicing alternativo, que difieren fundamentalmente en la longitud del dominio intracelular (Bole-Feysot *et al.*, 1998). Ratones *knockout* para el gen *PRLR* son estériles debido a que se produce un fallo durante la implantación embrionaria. Las hembras heterocigotas presentan ciclos irregulares, fertilidad reducida, desarrollo embrionario deficiente (Ormandy *et al.*, 1997) y un comportamiento maternal alterado (Lucas *et al.* 1998). El gen *PRLR* porcino se localiza en el cromosoma 16 (Vincent *et al.*, 1997). Aunque se desconoce la secuencia completa del gen *PRLR* porcino, se han descrito dos polimorfismos asociados con diferencias en el tamaño de camada y el número de tetinas (Vincent *et al.* 1998 y Putnová *et al.* 2002). El objetivo de este estudio consiste en secuenciar la región codificante del gen *PRLR* porcino con la finalidad de encontrar nuevos polimorfismos y estudiar sus efectos sobre caracteres reproductivos.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. *Extracción de RNA total y síntesis de cDNA*

Se obtuvieron muestras de hígado correspondientes a 8 cerdos de las razas Ibérico, Landrace, Large White y Pietrain. El RNA total fue extraído utilizando *TRIZOL*® *Reagent* (Gibco BRL, Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. La síntesis de cDNA se realizó mediante el kit *Thermoscript*® *RT-PCR* (Invitrogen) a partir de 1 1g de RNA total.

2. *Amplificación y secuenciación del cDNA PRLR*

Con el fin de amplificar el cDNA del gen *PRLR* porcino, se diseñaron tres pares de cebadores conservados tras alinear las secuencias ortólogas de cDNA de humano (AF416619), ratón (NM_011169), vaca (L02549) y conejo (J04510) disponibles en GenBank. La región codificante del gen fue amplificada en tres fragmentos de 386pb (exón2-5), 963pb (exón4-10) y 1157pb (exón10). Los productos de PCR se purificaron mediante el kit *Qia-Quick PCR purification KIT* (QiaGen) y se secuenciaron directamente mediante el kit *Big-Dye Terminator Cycle Sequencing v3.0* (Applied Biosystems). Las reacciones de secuenciación fueron analizadas en un aparato de electroforesis capilar *ABI Prism 310* (Applied Biosystems).

3. *Caracterización de Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) mediante Primer Extension Analysis*

Se amplificó un fragmento de 847pb correspondiente al exón 10 del gen *PRLR* mediante los cebadores PRLRe10-FW (5'-GGA GTT CCT GGA GGT GGA TGA-3') y PRLRe10-RV (5'-GTC TTT CGC AGC TGG AT T CT-3'). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 15 µl y contenían 60 ng de ADN genómico, 0.2 µM de cada cebador, 100 µM dNTPs, 1.5 µM $MgCl_2$ y 0.6 U de EcoTaq polimerasa (Ecogen). La reacción fue desnaturalizada durante 5 min a 94°C y posteriormente sometida a 35 ciclos de desnaturalización (94°C, 1 min), hibridación (63,8°C, 1 min) y extensión (72°C, 1min). El producto amplificado fue purificado enzimáticamente mediante el kit *EXOSAP-IT* (Amersham Biosciences Europe GMBH). Los 3 polimorfismos del gen *PRLR* fueron genotipados simultáneamente mediante el kit *SNapSHOT multiplex reaction* (Applied Biosystems). Las reacciones de extensión se realizaron en un volumen total de 5µL que incluían 7.5pmol de PRLR1 (5'-AGC GTG GAA AGC AAG CTG C-3'), 3.75pmol de PRLR2 (5'-AAA TTC TTT GTC TCC CCT AAG CCC-3') y 7.5pmol de PRLR3 (5'-TTA ATA AAA TTA GAA GGG CAA CCG AGC AGA-3').

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La comparación de la secuencia del gen *PRLR* porcino con las de genes ortólogos en otras especies mediante el programa BLASTN permitió demostrar que el cDNA *PRLR* porcino presenta una similitud nucleotídica del 88%, 86%, 84% y 80% con las secuencias bovina, leporina, humana y murina, respectivamente. El alineamiento de las secuencias *PRLR* de 8 individuos de las razas Landrace, Ibérico, Large White y Pietrain, permitió la identificación de 3 nuevos polimorfismos en el exón 10 (SNP1: T1217C, SNP2:T1528A y SNP3: G1439A). Dos de los polimorfismos (SNP1 y SNP3) están asociados a cambios aminoacídicos (SNP1: Leu/Pro en la posición 406 y SNP3: Arg/Lys en la posición 480) y, además, están situados en el dominio intracelular de la proteína, por lo que podrían tener interés desde un punto de vista funcional. En el caso Arg/Lys la sustitución aminoacídica es conservativa; sin embargo, la sustitución de una Leucina por una Prolina supone un cambio de un hidrocarburo saturado (Leu) a un anillo de pirrolidina (Pro) en la cadena lateral, lo que puede restringir la geometría de la proteína al introducirse un cambio brusco en la dirección de la cadena (Rawn, 1989).

Se ha diseñado un método de genotipado simultáneo para las tres mutaciones nucleotídicas basado en la técnica *Primer Extension Analysis Multiplex*. Mediante esta técnica se han genotipado 83 animales pertenecientes a distintas razas

porcinas y se han calculado las frecuencias alélicas de cada uno de los polimorfismos (Tabla 1).

Dado que la prolactina y su receptor juegan un papel crucial en la reproducción resultaría de gran interés realizar un estudio de asociación entre los polimorfismos del gen *PRLR* y caracteres reproductivos de importancia económica como el ritmo reproductivo, la prolificidad, el comportamiento y la capacidad maternal y la supervivencia embrionaria. Con dicha finalidad se están analizando 424 individuos pertenecientes a un cruce F2 entre la raza Ibérica y la hiperprolífica Meishan.

TABLA1. Frecuencias alélicas de los polimorfismos del gen *PRLR* en distintas razas porcinas

RAZAS	SNP1		SNP2		SNP3		N
	ALELO 1	*ALELO 2*	*ALELO 1*	*ALELO 2*	*ALELO 1*	*ALELO 2*	
Cerdo Ibérico	0.03	0.97	1	0	0.8	0.2	15
Landrace	0.53	0.47	0.47	0.53	0.44	0.56	17
Large White	0.13	0.87	0.87	0.13	0.83	0.17	15
Meishan	1	0	0.24	0.76	0	1	21
Pietrain	0.38	0.62	0.65	0.35	0.59	0.41	17

BIBLIOGRAFIA

1. Bole-Feysot, C.; Goffin, V:; Edery, M.; Binart, N. y Kelly, P.A. 1998. *Endocrine Reviews* 19: 225-268.
2. Hu, Z. Z.; Zhuang, L.; Meng, J.; Leondires, M. y Dufau, M. L., 1999. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84:1153-1156.
3. Lucas, B. K.; Ormandy, C. J.; Binart, N.; Bridges, R. S y Kelly, P.A., 1998. *Endocrinology* 139:4102-7.
4. Ormandy, C.J.; Camus, A.; Barra, J.; Damotte, D.; Lucas, B.; Buteau, H.; Edery, M.; Brouchard, N.; Babinet, C.; Binart, N. y Kelly, P.A.1997. *Gene dev.* 11: 167-178
5. Putnová, L.; Knoll A.; Dvorak, J. y Scepica, S., 2002. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 119: 57-63
6. Rawn, J. D., 1989. *Bioquímica*. Interamericana Mc Graw Hill (Ed). Vol I: 54-58
7. Vincent, A. L.; Wang, L.; Tuggle, C. K., Robic, A. y Rothschild, M. F. 1997. *Mammalian Genome* 8: 793-794.
8. Vincent, A. L.; Evans, G.; Short, T.H.; Southwood, O. I. y Plastow, G.S., 1998. *Proceedings 6th World Cong. Genet. App. Liv. Prod.* 27:15-18.