POLIMORFISMO DE LOS GENES DE LA MALATO DESHIDROGENASA (*MDH1*) Y DEL ENZIMA MÁLICO (*ME1*) PORCINOS

Oriol Vidal[1], Luis Gómez-Raya[2], Armand Sánchez[1], Marcel Amills[1]

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

INTRODUCCIÓN

Los enzimas malato deshidrogenasa soluble (MDH1) y enzima málico citosólico dependiente de $NADP^+$ (ME1) participan en la biosíntesis de los ácidos grasos catalizando respectivamente la reducción del oxalacetato a malato y la descarboxilación oxidativa del malato en piruvato y NADPH. Ambas reacciones resultan fundamentales en el metabolismo de los ácidos grasos puesto que generan el poder reductor, en forma de NADPH, necesario para la biosíntesis de los mismos y además posibilitan la transferencia de acetil-CoA desde la mitocondria al citosol por la vía del sistema de transporte del tricarboxilato.
La MDH1 es un dímero formado por dos subunidades idénticas. Existe otra isoforma denominada MDH2 y localizada a nivel mitocondrial. El gen *MDH1* porcino ha sido mapeado en el cromosoma 3 (Bruch et al. 1996) y el cDNA ha sido secuenciado completamente (Trejo et al. 1996). En el ratón, el gen *MDH1* tiene un tamaño de 14 kb y posee 9 exones (Setoyama et al. 1988).
El ME1 posee una estructura tetramérica. Existen otras dos isoformas del enzima málico que ejercen su función a nivel mitocondrial y son dependientes de NAD^+ (ME2) o $NADP^+$ (ME3). En la especie porcina se conoce la secuencia completa del cDNA del *ME1* y ha sido mapeado en el cromosoma 1 (Nunes et al. 1996). En la rata, el gen *ME1* tiene un tamaño de 95 kb y posee 14 exones (Morioka et al. 1989). La expresión del gen *ME1* en ratón (Nikodem et al. 1989) y en pollo (Goodridge et al. 1998) está regulada por factores de tipo nutricional y hormonal.
La finalidad principal de este trabajo ha consistido en secuenciar el cDNA *MDH1* y *ME1* de cerdos de distintas razas con el objetivo de identificar polimorfismos que puedan ser empleados en estudios de asociación con caracteres productivos, especialmente aquellos relacionados con el depósito graso.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de cDNA total porcino: Se obtuvo el RNA total a partir de muestras de hígado de cerdos de las razas Pietrain, Large White, Landrace, Vietnamita e Ibérica. Cada muestra se congeló en nitrógeno líquido y fue pulverizada con un mortero y homogenizada mediante un politrón. El RNA total se purificó mediante el preparado *Trizol reagent* (Gibco BRL, Life Technologies) y la síntesis de cDNA se llevó a cabo mediante el kit *ThermoScript RT-PCR System kit* (Invitrogen S.A.).

Amplificación del cDNA MDH1 y ME1: Los oligonucleótidos empleados en la reacción de amplificación del cDNA de la *MDH1* fueron MDH2F: 5'-GAG TGC TTG TGA CTG GAG CA-3' y MDH9R: 5'-CAG GCA GAG GAA AGA AAT TCA-3'. El perfil térmico fue de 94 ºC – 1 min, 60 ºC – 1 min, 72 ºC – 2 min durante 35 ciclos. Para amplificar el cDNA de *ME1* se utilizaron dos juegos de oligonucleótidos: ME1.1F: 5'-CCA CCT TGC TTC ATC AGT CA-3' y ME1.1R: 5'-ATC TGA GAC CGG ACA AAT GC-3', situados en los exones 2 y 14 respectivamente, y ME1.2F: 5'-CCT GAA CCC TCA AAC AAG GA-3' y ME1.2R: 5'-AAG CAT TCT GGA TCT CTT CAA AA-3', situados en la región 3' UTR. El perfil térmico fue de 94ºC – 1 min, 60 ºC (ME1.1) o 55 ºC (ME1.2) – 1 min y 72 ºC – 2 min durante 35 ciclos. Las condiciones de la reacción de PCR fueron las mismas para cada uno de los tres juegos de

oligonucleótidos: 1.5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTPs, 0.2 µM de cada *primer*, 2 µl de cDNA y 0.5 U de Taq DNA polimerasa (Ecogen) en un volumen final de 20 µl.

Secuenciación del producto amplificado: Los productos amplificados se secuenciaron mediante el *kit ABI PRISM Cycle sequencing kit* (Perkin Elmer Biosystems) utilizando los mismos oligonucleótidos descritos anteriormente. Las reacciones de secuenciación fueron analizadas en un aparato de electroforesis capilar *ABI PRISM 310* (Perkin Elmer Biosystems).

Genotipado del polimorfismo C/T del exón 7 del gen MDH1: un fragmento del gen *MDH1* que incluye parte del exón 6, el intrón 6 y parte del exón 7 se amplificó mediante los oligonucleótidos MDH6F: 5'-TCA TCT GGG GAA ACC AT- y MDH7R: 5'-CTG GGG TTC CAA ACC AGA T-3'. El perfil térmico fue 94 °C – 1 min, 61 °C – 1 min, 72 °C – 2 min durante 35 ciclos. Las condiciones de la reacción de amplificación fueron 1.5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTPs, 0.2 µM de cada *primer*, 30 ng de DNA y 0.5 U de Taq DNA polimerasa (Ecogen) en un volumen final de 20 µl. El producto amplificado fue purificado mediante el *ExoSAP-IT kit* (Amersham Biosciences Europe GMBH) y la mutación fue genotipada mediante el *SnaPshot™ ddNTP Primer Extensión kit* (Applied Biosystems). La secuencia del oligonucleótido usado en la reacción de extensión fue SNP7, 5'-ATA TAC TGC GGC AAA AGC CAT TTG TGA CCA-3'.

Genotipado de los polimorfismos de la región 3'-UTR del gen ME1: un fragmento de 1.5 kb de la región 3'-UTR del gen se amplificó mediante los oligonucleótidos ME1.2F y ME1.2R. Las condiciones de PCR fueron las mismas que las descritas en el anterior apartado. El producto amplificado fue purificado mediante el *ExoSAP-IT kit* (Amersham Biosciences Europe GMBH) y las mutaciones fueron genotipadas mediante el *SnaPshot™ ddNTP Primer Extensión kit* (Applied Biosystems). Los oligonucleótidos usados en las reacciones de extensión fueron: SNPa 5'-TAT AGC CTA CAT TTC TAA CTC CA-3' (T/C_{1706}), SNPb 5'-TTT AAA TAT TGG GAT CTT TTA TAA TGA-3' (G/T_{1762}), SNPc 5'-TAA TTG ATA ATT TCC CCT TAA CAC TCT AAA-3' (A/C_{1807}), SNPd 5'-TAA TAA TAT AAT TAG GGT AAA CAT CAC AGT AGA CA-3' (C/A_{1857}) y SNPe 5'-ATA TAT ATA TAT AAA TTA TTT TGC TTC ATT TAC TTT CTT G-3' (T/A_{1880}).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el caso del gen *MDH1*, se amplificó un fragmento de 1 kb que abarca los exones 2 y 9 mientras que para el gen *ME1* se amplificaron dos fragmentos de aproximadamente 1.5 kb que incluyen los exones 2 al 14 y la región 3'-UTR, respectivamente. Estos fragmentos se amplificaron y secuenciaron en diez individuos de distintas razas porcinas. Las secuencias obtenidas se compararon con el programa Multalin (Corpet et al. 1988). Se detectó la presencia de un polimorfismo silencioso en el exón 7 del gen *MDH1*, mientras que para *ME1* se identificaron 5 mutaciones localizadas en la región 3' UTR (ver Tabla 1). Cuatro de las mutaciones detectadas en la región 3' UTR del gen *ME1* coinciden en un mismo haplotipo en todos los individuos analizados.

MDH1 y *ME1* son, dada su función esencial en la lipogénesis, genes candidatos a considerar en estudios de asociación con caracteres de deposición de grasa. El caso del gen *ME1* es especialmente interesante porque se han descrito diferencias de actividad enzimática entre cerdos Landrace e Ibéricos (Morales et al. 2002). A pesar de que las mutaciones encontradas en el cDNA del *ME1* no provocan ningún cambio aminoacídico podrían influir en la expresión o la estabilidad y la vida media del tránscrito, tal como se ha descrito para polimorfismos en la zona 3' UTR de la beta-globina (Bilenoglu et al. 2002) y del factor de necrosis tumoral alfa, TNFα (Di Marco et al. 2001). Por este motivo se han optimizado métodos de genotipado para las distintas mutaciones identificadas en ambos genes basándose en la técnica de *primer extension analysis*. Actualmente se está realizando el genotipado de

546 cerdos Landrace de una población comercial para realizar un estudio de asociación entre variantes genéticas de *MDH1* y *ME1* y caracteres de calidad de la carne y de la canal.

Tabla1. Frecuencias alélicas para cada una de las mutaciones identificadas. Dichas frecuencias han sido calculadas a partir de 10 individuos de cada raza. Las posiciones de las mutaciones de los genes *MDH1* y *ME1* (indicadas mediante subíndices) están referidas a las secuencias con número de acceso U44846 y X93016, respectivamente.

GEN	MUTACION	RAZA		
		Large White	Pietrain	Landrace
MDH1	C_{759}	0,63	0,31	0,29
	T_{759}	0,37	0,69	0,71
ME1	T_{1706}	0,25	0,7	0,5
	C_{1706}	0,75	0,3	0,5
	G_{1762}	0,25	0,7	0,5
	T_{1762}	0,75	0,3	0,5
	A_{1807}	0,25	0,7	0,5
	C_{1807}	0,75	0,3	0,5
	C_{1857}	0,25	0,7	0,5
	A_{1857}	0,75	0,3	0,5
	T_{1880}	0,95	1	0,9
	A_{1880}	0,05	0	0,1

BIBLIOGRAFÍA

Bilenoglu O, Basak AN, Russell JE. 2002. Br J Haematol 119:1106-14.

Bruch J, Rettenberger G, Leeb T, Meier-Ewert S, Klett C, Brenig B, Hameister H. 1996. Cytogenet Cell Genet 73:164-7.

Corpet, F. 1988. Nucleic Acids Res. 16: 10881-90.

Di Marco S, Hel Z, Lachance C, Furneaux H, Radzioch D. 2001. Nucleic Acids Res 29:863-71.

Goodridge AG, Thurmond DC, Baille RA, Hodnett DW, Xu G. 1998. Europ J Nutr. 37 Suppl 1:8-13

Morales J, Perez JF, Martin-Orue SM, Fondevila M, Gasa J. 2002. Br J Nutr 88:489-498.

Morioka H, Magnuson MA, Mitsuhashi H, Song MK, Rall JE, Nikodem VM. 1989. Proc Natl Acad Sci USA. 86:4912-6.

Nikodem VM, Magnuson MA, Dozin B, Morioka H. 1989. Endocr Res 15:547-64.

Nunes M, Lahbib-Mansais Y, Geffrotin C, Yerle M, Vaiman M, Renard C. 1996. Mamm Genome 7: 815-21.

Setoyama C, Joh T, Tsuzuki T, Shimada K. 1988. J Mol Biol. 202:355-64.

Trejo F, Costa M, Gelpi JL, Busquets M, Clarke AR, Holbrook JJ, Cortes A. 1996. Gene 172:303-8.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a CIA "El Dehesón del Encinar", COPAGA y Nova Genètica por ceder las muestras de sangre y tejidos utilizadas en este estudio. El presente trabajo fue financiado con el proyecto FEDER (2FD97-0916-CO2-O2) y con una beca F.I. a Oriol Vidal (DGU, Generalitat de Catalunya).