CARACTERIZACIÓN DEL GEN DE LA MALATO DESHIDROGENASA (*MDH1*) PORCINO.

Oriol Vidal[1], José Luis Noguera[2], Armand Sánchez[1] y 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

El enzima malato deshidrogenasa soluble (MDH1) participa en la biosíntesis de los ácidos grasos catalizando la reducción del oxalacetato a malato. Esta reacción resulta fundamental en el metabolismo de los ácidos grasos puesto que se genera el poder reductor, en forma de NADPH, necesario para la biosíntesis de los mismos. Además esta ruta bioquímica posibilita la transferencia de acetil-CoA desde la mitocondria al citosol por la vía del sistema de transporte del tricarboxilato.

El gen *MDH1* porcino ha sido mapeado en el cromosoma 3 (Wintero *et al.* 1998) y el cDNA ha sido secuenciado completamente (Trejo *et al.* 1996).

La finalidad principal de este trabajo ha consistido en secuenciar el cDNA *MDH1* 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 Piétrain, Large White, Landrace, Vietnamita e Ibérica. 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: 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.

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

Genotipaje 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 ºC – 1 min, 61 ºC – 1 min, 72 ºC – 2 min durante 35 ciclos. 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'.

Genotipaje de la inserción polimórfica LINE 1 del intrón 6 del gen MDH1: un fragmento del gen *MHD1* que incluye parcialmente el intrón 6 se amplificó

mediante los oligonucleótidos MDHi6F: 5'- CCT GGG TGT CTC TCT AAG GGT G -3' y MDHi6R 5'- AGG AAA ACT GCA AAT CCT CAA AGA -3', situados a ambos lados del elemento LINE. El perfil térmico fue 94 ºC – 1 min, 64 ºC – 1 min, 72 ºC – 1 min durante 35 ciclos.

Análisis filogenético: el análisis filogenético de las secuencia *MDH1ψ* obtenida con las secuencias de cerdo, de humano (número de accesso del ENSEMBL ENSG00000019179) y de ratón (número de accesso del ENSEMBL ENSG00000014641) se ha llevado a cabo con el programa MEGA v2.1 (Kumar et al. 2001), utilizando la distancia genética de Kimura con dos parámetros (Kimura 1980) para construir un árbol *neighbor-joining*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se amplificó un fragmento del gen *MDH1* de 1 kb que abarca los exones 2 y 9 y se secuenció en diez individuos de distintas razas porcinas. Se detectó la presencia de un polimorfismo silencioso $C \rightarrow T_{759}$ en el exón 7 del gen *MDH1* (Tabla 1).

Tabla1. Frecuencias alélicas para la mutación identificada, calculada a partir de 10 individuos de cada raza. La posición de la mutación del gen *MDH1* (indicada mediante subíndices) está referida a la secuencia con número de acceso U44846.

GEN	MUTACION	RAZA		
		Large White	Piétrain	Landrace
MDH1	C_{759}	0,63	0,31	0,29
	T_{759}	0,37	0,69	0,71

En la reacción de amplificación llevada a cabo con los oligonucleótidos MDH6F y MDH7R, que se diseñaron para el genotipaje del polimorfismo, se amplificaron tres fragmentos de 1.700 pb, 1.400 pb y 700 pb.

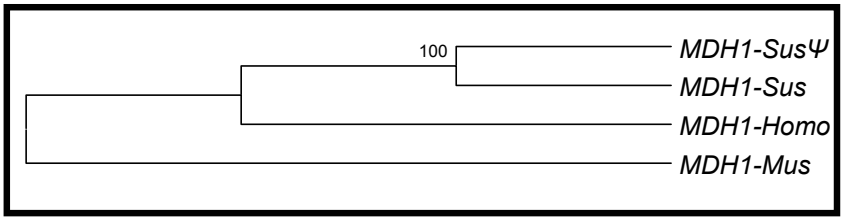
El alineamiento de las tres secuencias permitió determinar que los fragmentos de 0.7 kb y 1.4 kb corresponden a una región del gen *MDH1* porcino comprendida entre los exones 6 y 7 que difieren por la presencia/ausencia de una inserción de 0.7 kb correspondiente a un retrotransposón *long interspersed nucleotide element* (LINE) truncado en 5'. Esta inserción da lugar a dos alelos, que segregan en la distintas razas genotipadas (Tabla 2).

Tabla 2. Frecuencias alélicas para el polimorfismo generado por la presencia de una inserción de tipo L1Ss. Las frecuencias fueron calculadas en 118 cerdos de las razas Piétrain, Large White, Landrace, Ibérico y Meishan.

Polimorfismo LINE 1		LINE	NO LINE
Raza	Piétrain (N=24)	0,54	0,46
	Large White (N=24)	0,50	0,50
	Landrace (N=24)	0,30	0,70
	Ibérico (N=27)	0,10	0,90
	Meishan (N=19)	0,20	0,80

Por otra parte, el fragmento de 1.7 kb corresponde a una secuencia que presenta una similitud nucleotídica del 84 % con la secuencia del gen *MDH1* y que posee cuatro inserciones en tándem de *short interspersed nucleotide elements* (SINE) en el intrón 6. Aunque la secuencia identificada es parcial y no permite realizar un análisis filogenético en profundidad, el fragmento secuenciado se agrupa con la secuencia *MDH1* de cerdo (Fig. 1). Estos datos sugieren la existencia de un pseudogen *MDH1ψ* en el genoma porcino que probablemente ha surgido a través de un fenómeno de duplicación del gen *MDH1*. La presencia del intrón 6 en la secuencia *MDH1ψ* parece descartar que se trate de un pseudogen procesado.

Figura 1. Análisis filogenético de un fragmento de la secuencia *MDH1Ψ* (exón 6 al 7) con las secuencias *MDH1* de cerdo, humano (número de acceso del ENSEMBL ENSG00000014641) y ratón (número de acceso del ENSEMBL ENSMUSG00000019179).



En definitiva, en el presente trabajo hemos caracterizado la existencia de dos polimorfismos en el gen *MDH1* porcino y hemos identificado una secuencia, que hemos denominado *MDH1ψ*, compatible con la existencia de un pseudogen *MDH1ψ* en el genoma porcino. El próximo paso consistiría en realizar análisis de asociación entre los polimorfismos encontrados en el gen *MDH1* y caracteres productivos así como el cartografiado del locus *MDH1ψ* mediante un panel de células somáticas híbridas irradiadas.

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).

BIBLIOGRAFÍA

Kimura, M. (1980). Journal of Molecular. Evolution 16:11- 120.
Trejo F. et al. (1996). Gene 172:303-308.
Wintero et al. (1998). Mammalian Genome 9:366-372.