CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GEN DE LA ACETIL-COA CARBOXILASA α (*ACACA*) PORCINA

David Gallardo, Jordi Gillet, Óscar Ramírez, Armand Sànchez, Marcel Amills

Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193.

INTRODUCCIÓN

La acetil-CoA carboxilasa α (*ACACA*) es un enzima citoplasmático fundamental para la biosíntesis de los ácidos grasos de cadena larga puesto que cataliza la formación de malonil CoA. A pesar que el gen de la *ACACA* se expresa de forma ubicua, dicha expresión es superior en tejidos lipogénicos como p.e. el tejido adiposo, el hígado y la glándula mamaria (durante la lactación). En humano, el gen *ACACA* tiene una longitud de 330 Kb mientras que el mRNA tiene un tamaño de 10 kb aproximadamente. Se han identificado 64 exones, incluyendo 7 exones alternativos denominados 1A, 1B, 1C, 3, 5A', 5A y 5B. Asimismo, se ha descrito la existencia de 3 promotores alternativos PI, PII y PII situados de forma 5' adyacente a los exones 1, 2 y 5A, respectivamente (Mao et al. 2003).

En porcino, el gen *ACACA* ha sido cartografiado en el cromosoma 12 (Calvo et al. 2000). Asimismo, se ha demostrado que la actividad enzimática de *ACACA* está influida por factores relacionados con la edad, la raza y la nutrición. Por ejemplo, se ha demostrado que la suplementación de la dieta con ácido linoleico conjugado induce un incremento de la actividad de *ACACA* (Corino et al. 2003). Asimismo, en un experimento en el que se han comparado dos líneas Alentejana (AL) y Large White (LW) se ha observado que la actividad de *ACACA* es de 3 a 9 veces superior en los lechones AL que en los LW (Freire et al. 1998). Ello sugiere la existencia de factores genéticos que regulan la actividad de este enzima. El conocimiento de la secuencia del gen *ACACA* porcino y la identificación de polimorfismos que puedan ser empleados como marcadores en estudios de asociación resultarían fundamentales para comprender mejor la arquitectura genética de la biosíntesis de lípidos.

MATERIAL Y METODOS

Amplificación del cDNA *ACACA* porcino: Se realizaron extracciones de RNA a partir de muestras de hígado correspondientes a 11 individuos de las razas Piétrain (1), Large White (1), Landrace (1), Ibérico (1), Meishan x Ibérico (1) y Duroc (6). Para ello se utilizó el protocolo descrito por Ramírez et al. (2003). La síntesis de cDNA se llevó a cabo mediante el ThermoScript RT-PCR System kit (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los oligonucleótidos empleados en la reacción de amplificación fueron:

- *Fragmento 1* (exón 3 a 13): ACC-1-FW; 5'-CTG GAG CTG AAC CAG CAC TC-3', ACC-1-REV; 5'-CCC ATG GCA ATC TGG AGC TG-3'.
- *Fragmento 2* (exón 11 a 24): ACC-2-FW; 5'-TGC TAC TCC AGC AGT ATT TGA ACA-3', AAC-2-REV; 5'-ATC ACC ACA GCC TTC ATG TG-3'.

- *Fragmento 3* (exón 22 a 38): ACACAF3-FW; 5'-GTT TCC CAG CCA GCA GAT TG-3', ACACAF3RV; 5'-AGT CAG TCC GGA CAT TTG TAT TG-3'.
- *Fragmento 4* (exón 37 a 46): ACC4N-F; 5'-GTG GGC ACA GAA GTG ACA GA-3', ACC4N-R; 5'-GTT GTG CAT GAT CTG GAT GC-3'.

Todos los oligonucleótidos empleados fueron diseñados mediante el software Primer Express 2.0 usando como molde la secuencia *ACACA* bovina (número de acceso de Genbank: NM_174224). La composición de la reacción de PCR para los fragmentos 1 y 2 fue: 1.5 mM $MgCl_2$, 100 µM dNTPs, 0.5 µM de cada primer, 2-3 µl de reacción de transcripción reversa y 1 U de Taq DNA polimerasa (Ecogen) en un volumen final de 25 µl. El perfil térmico fue de un ciclo a 94 ºC-3 min, seguido de 35 ciclos a 94 ºC-1 min, 67 ºC-2 min, 72 ºC-3 min y una extensión final a 72 ºC-5 min. Las condiciones de la reacción de PCR para los fragmentos 3 y 4 fueron: 1.5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTPs, 0.2 µM de cada primer, 2-3 µl de reacción de transcripción reversa y 1 U de Taq DNA polimerasa (Ecogen) en un volumen final de 25 µl. El perfil térmico para el fragmento 4 fue de un ciclo a 94 ºC-3 min, seguido de 35 ciclos a 94 ºC-1 min, 65ºC-2 min, 72 ºC-3 min y una extensión final a 72 ºC-5 min. Las condiciones fueron las mismas para el fragmento 3 a excepción de la temperatura de hibridación que en lugar de 65 ºC fue de 66 ºC.

Secuenciación del producto amplificado: Los productos amplificados fueron purificados con el QIAquick Gel Extraction kit y se realizó la secuenciación de los mismos mediante el kit de secuenciación BigDye ™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (version 3.1, Applied Biosystems). Las reacciones de secuenciación fueron analizadas en un aparato de electroforesis capilar ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems). Para secuenciar el cDNA *ACACA* se emplearon los oligos ACC-1-FW, ACC1-SEQ-R; 5'-GAT CAT TAC TGG ATA TCC AAC TTC-3', ACACAF1RV-NESTED; 5'-CAT GGC AAT CTG CAG CTG T-3', ACC-2-FW, AAC-2-REV; ACC2-SEQ-F; 5'-GGC GGA CTT CAT GAA TTT GC-3', ACC2-SEQ-R; 5'-TTG GCT ATG ACA CAG CCA GG-3', ACACAF3-FW, ACACAF3RV, ACACAF3FW-INTERN; 5'-CTA TCT TCC TAT CGG CTA TTG ACA TG-3', ACC4N-F, ACC4N-R, ACC4-SEQ-F; 5'-CCT CCA GGC AGA ACT GAA AA-3'. Las secuencias obtenidas fueron alineadas mediante el programa Multalin (Corpet 1988) con la finalidad de identificar posibles posiciones polimórficas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha secuenciado un total de 4,3 Kb del gen *ACACA* porcino mediante la amplificación de cuatro fragmentos parcialmente solapados de aproximadamente 1,6 kb El fragmento secuenciado incluye los exones 3 a 29 y 37 a 45, es decir un 66% de la región codificante El análisis Blastn de esta secuencia ha permitido determinar que posee una similitud nucleotídica del 92-93% con las secuencias bovina (NM_174224.2) y ovina (X80045.1). El alineamiento de la secuencia aminoacídica *ACACA* porcina con sus ortólogos bovino y ovino mediante el programa ClustalW evidenció también un elevado nivel de similitud (*percentage score* = 97-98).
El análisis de la secuencia codificante con el programa Scan Prosite ha permitido identificar varios dominios funcionales característicos de este enzima:

un dominio biotin carboxilasa (BC), que contiene un lugar de unión al ATP, un dominio biotinil lipoil y un dominio carboxil transferasa (CT) El dominio BC está implicado en el proceso de carboxilación de la biotina mientras que el dominio funcional CT se encarga de transferir dicho grupo carboxilo de la biotina al sustrato aceptor, es decir al acetil-CoA.

Al comparar las secuencias nucleotídicas de los distintos individuos analizados hemos identificado ocho polimorfismos cuya posición está detallada en la Tabla 1. Todos los SNP identificados son silenciosos por lo cual, en principio, no resulta esperable que afecten a la función o a la expresión de la proteína. Actualmente, estamos procediendo a secuenciar las 3 kb restantes, que corresponden a las regiones 3'UTR y 5' y 3' codificante. La finalidad de este trabajo consiste en emplear los polimorfismos identificados para realizar un análisis de asociación con caracteres de engrasamiento, composición de ácidos grasos y metabolismo del colesterol en una población Duroc.

Tabla 1. Polimorfismos identificados en el gen de la *ACACA* porcina

Polimorfismo	Posición (codón)
C/G	462
T/C	542
C/T	738
T/G	771
G/A	1533
G/T	1702
T/G	1703
T/C	1732

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. J. L. Noguera del centro UdL-IRTA su contribución en la obtención de muestras de tejidos necesarias para el trabajo experimental. Este trabajo ha sido financiado con el proyecto CICYT *Arquitectura genética de los componentes lipídicos de la carne porcina relacionados con la calidad y la salud humana* (AGL2002-04271-C03-03).

BIBLIOGRAFÍA

Calvo et al. 2000. Cytogenet. Cell. Genet. 90: 238-239
Corino et al. 2003. J. Anim. Sci. 81: 2219-2229
Freire et al. 1998. Ann. Nutr. Metab. 42: 90-95
Mao et al. 2003. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100: 7515-7520
Ramírez et al. 2003. ITEA 24: 447-449