CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES PORCINOS DE LAS PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE ÁCIDOS GRASOS (SLC27A / FATP *solute carrier family 27a*)

Gallardo, D.[1], Quintanilla, R.[1] y Pena, R.N.[1]
[1]Genètica i Millora Animal, IRTA-Lleida, 25198 Lleida. david.gallardo@irta.cat

INTRODUCCIÓN

Los ácidos grasos de cadena larga (LCFAs), además de ser metabolitos importantes de la homeostasis energética, poseen varias funciones celulares fundamentales, incluyendo la activación de factores de transcripción nuclear. No obstante, para poder tener efecto, los LCFAs deben traspasar la membrana plasmática, un proceso que puede ocurrir por difusión o por sistemas de transporte específicos mediados por proteínas. En este sentido las proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATPs) forman parte de este tipo de proteínas de transmembrana cuya variabilidad puede alterar el transporte de los ácidos grasos de cadena larga a las células, por lo que su identificación y caracterización puede resultar de gran interés. En humano y ratón los genes FATPs comprenden una familia de seis proteínas altamente homólogas presentes en prácticamente todos los tejidos del cuerpo. Sin embargo, en la especie porcina se dispone de poca información sobre esta familia. En la especie humana, las proteinas FATP presentan una cierta especificidad tisular, observándose como la proteína FATP1 es la mayoritaria en los tejidos adiposos (Schaffer y Lodish, 1994), si bien también se ha identificado en corazón y en músculo esquelético (Binnert et al., 2000, Hirsch et al., 1998, Schaffer y Lodish, 1994). En cuanto al gen FATP4 es el único FATP expresado en el intestino delgado y se localiza en el borde apical de las células epiteliales, siendo responsable de la absorción de los ácidos grasos de cadena larga procedentes de la dieta. También cabe destacar que FATP1 y FATP4 son los FATPs predominantes en el cerebro (Febbraio, et al. 1999). Por otra parte, un estudio de Meirhaeghe et al. (2000) ha identificado un polimorfismo en el intrón 8 del gen FATP1 asociado al aumento de los niveles de triglicéridos en plasma. El presente trabajo aborda el estudio molecular de los genes FATP1 y FATP4 con el objetivo de determinar si existen mutaciones en dichos genes que puedan afectar a la variabilidad de caracteres relacionados con el metabolismo lipídico en porcino.

MATERIAL Y MÉTODOS

Amplificación parcial del cDNA FATP1 y FATP4 porcino

Se realizaron extracciones de RNA a partir de muestras de hígado correspondientes a 14 individuos de las razas Meishan (3), Large White (1), Landrace (2) y Duroc (8). La síntesis del cDNA se llevó a cabo mediante el kit Revert Aid MuMLV-RT (Fermentas) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las reacciones de secuenciación fueron analizadas en un equipo de electroforesis capilar ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems) empleando los oligos mFATP_F1; 5'-GAG CTG GCG ACA GAA CAA A-3' y mFATP_R1; 5'-AGC TGT CCG CTC ACC TCG-3' para el fragmento 1 del gen FATP1 (exón 1 a 3), mientras que se utilizaron los oligos FATP4_F2; 5'-TTC TAC ATC TAC ACG TCC GGC AC-3' y FATP4_R2; 5'-TTG AGG TAG CCG TCG AAG C-3' (exón 5 a 10) y FATP4_F3; 5'-TGG TGG GCA CCA TCG TCC-3' y FATP4_R3; 5'-GGA CTT GGG GCA AAT CAC AG-3' (exón 10 a 13) para los fragmentos 2 y 3 del gen FATP4. Todos los oligonucleótidos empleados fueron diseñados mediante el software Primer Express 2.0 usando como referencia las secuencias porcinas NM_001083931 para el gen FATP1 y las secuencias trace (gnl|ti|470929409, 448054674, 448055756, 470951804, 1380786935 y 1377108472) para el gen FATP4. La composición de la reacción de PCR para los distintos fragmentos fue: 2 mM $MgCl_2$, 200 µM de dNTPs, 0.3 µM de cada primer, 0.5 µl de reacción de transcripción reversa y 1 U de Taq DNA polimerasa (5'Prime) en un volumen final de 25 µl, a excepción del fragmento 1 del gen FATP1 cuya concentración de primers fue de 0.4 µM y del fragmento 2 del gen FATP4 cuya concentración de $MgCl_2$ fue de 2.5 mM. En todos los casos el perfil térmico fue de un ciclo a 95 ºC-5 min, seguido de 35 ciclos a 95 ºC-20 seg, 55 ºC-20 seg, 72 ºC-40 seg, seguido de una extensión final a 72 ºC-5 min, a excepción del fragmento 1 del gen FATP1 donde se utilizó una Tm de 52 ºC. Finalmente, se utilizó el programa Clustalw para realizar el alineamiento de las secuencias permitiendo la identificación de SNPs.

Genotipado del FATP1c.491C>T del exón 2 del gen FATP1
Se ha puesto a punto la técnica de PCR-RFLP para genotipar el SNP1 del gen FATP1 en la población Duroc objeto de estudio en aproximadamente 330 individuos. Los oligonucleótidos empleados en la reacción de amplificación fueron: FATP1_SNP1_FW; 5'-TCT CCG TGT TGA TCC GTG T-3' y FATP1_SNP1_RV; 5'-CAC TGC CAG CTC CTC TCC-3', obteniendo una banda de 389 pares de bases. Los oligonucleótidos empleados fueron diseñados mediante el software Primer Express 2.0 usando como molde la secuencia porcina de FATP1 (NM_001083931). La composición de la reacción de PCR fue: 1 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTPs, 0.2 µM de cada primer, 50 ng de ADN genómico y 0.3 U de Taq DNA polimerasa (5'Prime) en un volumen final de 15 µl. El perfil térmico fue de un ciclo a 95 ºC-5 min, seguido de 35 ciclos a 95 ºC-20 seg, 64 ºC-20 seg, 72 ºC-40 seg y una extensión final a 72 ºC-5 min. Posteriormente, se utilizó el enzima de restricción *Xag*I para realizar el genotipado de las muestras.

Genotipado del FATP4c.1882C>G (Leu→Val) del exón 13 del gen FATP4
Se han utilizado los oligonucleótidos FATP4_SNP3_F; 5'-CAG AAG ACA GAC CTG CGG AA-3' y FATP4_SNP3_R; 5'-CGG TCT CAG TCT CAG CCT GG-3') para amplificar un fragmento de 402 pares de bases. La composición de la reacción de amplificación fue: 0.75 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTPs, 0.3 µM de cada primer, 25 ng de ADN genómico y 0.3 U de Taq DNA polimerasa (5'Prime) en un volumen final de 15 µl. El perfil térmico consistió en un ciclo a 95 ºC-5 min, seguido de 35 ciclos a 95 ºC-20 seg, 60 ºC-30 seg, 72 ºC-30 seg y una extensión final a 72 ºC-5 min. Se utilizó el enzima de restricción *MspA1*I para realizar el genotipado de las muestras.

Análisis de asociación para los ácidos grasos en músculo y para los niveles de lípidos plasmáticos
A partir de los genotipos disponibles para los animales de la población Duroc, se ha realizando un análisis preliminar de asociación del FATP1c.491C>T con las concentraciones de lípidos séricos (colesterol total, LDL, HDL y triglicéridos) y la composición en ácidos grasos de la grasa intramuscular de los músculos *longissimus dorsi* y *gluteus medius*. El modelo utilizado para el análisis fue el siguiente: $y_i = \mu + lote_i + \beta cov_i + g_j + e_{ij}$ donde: y_i es el fenótipo analizado; $lote_i$ es el efecto fijo lote de engorde, cov_i es una covariable (grasa dorsal para las medidas de colesterol sérico y grasa intramuscular para el contenido en ácidos grasos) y g_j es el efecto del genotipo para el polimorfismo analizado del gen FATP1. Para todos los fenotipos se calcularon las medias mínimo-cuadráticas de cada uno de los genotipos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al comparar las secuencias de los distintos individuos analizados se han identificado tres SNPs, dos de los cuales se localizan en el gen FATP4 y uno en el gen FATP1. Todos los SNPs identificados a excepción del FATP4c.1882C>G son silenciosos, por lo que los resultados preliminares obtenidos deben interpretarse con cautela. En cuanto a los resultados del genotipado del FATP4c.1882C>G, todos los individuos analizados resultaron homocigotos CC, por lo que no se ha podido realizar un estudio de asociación. El análisis de asociación del FATP1c.491C>T (Tabla 1) ha revelado relaciones significativas con los niveles séricos de lipoproteínas LDL, así como con el contenido en ácidos grasos saturados en ambos músculos. En este sentido, tanto en el músculo *longissimus dorsi* como en *gluteus medius* se ha observado una asociación significativa de este polimorfismo con el contenido en ácido esteárico de la grasa intramuscular, presentando los individuos heterocigotos una mayor concentración de este ácido. El contenido en ácido palmítico presenta una tendencia similar, si bien no llega a alcanzar la significación estadística. Actualmente se está optimizando un protocolo de qPCR para estudiar la expresión de los genes FATP1-6 en distintos tejidos con la finalidad de caracterizar su patrón de expresión. Además, también se está realizando el mapeo RH para localizar las posiciones de estos 6 genes en el genoma porcino.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado mediante el proyecto *Mapeo e identificación de genes implicados en el metabolismo lipídico en porcino, la calidad de la carne y la calidad del jamón curado* (AGL2007-66707-C02-02). Agradecemos a Selección Batallé la generación del material animal, a David Almuzara su apoyo técnico y a Isabel Díaz la realización de los análisis de calidad de carne.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Binnert, C., Koistinen, H.A., Martin, G., Andreelli, F., Beetling, P., Koivisto, V.A., Laville, M., Auwerx, J., Vidal, H. 2000. Am. J. Physiol. 279: 1072–1079. • Febbraio, M., Abumrad, N.A., Hajjar, D.P., Sharma, K., Cheng, W., Pearce, S.F., Silverstein, R.L. 1999. J. Biol. Chem. 274: 19055–19062 • Hirsch, D., Stahl, A., Lodish, H.F. 1998. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 8625–8629. • Meirhaeghe, A., Martin, G., Nemoto, M., Deeb, S., Cottel, D., Auwerx, J., Amouyel, P., Helbecque, N. 2000. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 20: 1330–1334. • Schaffer, J.E., Lodish, H.F. 1994. Cell. 79: 427–436.

***Tabla 1**. LSmeans de los niveles de ácidos grasos de los músculos longissimus dorsi y gluteus medius para los distintos genotipos del FATP1c.491C>T del gen FATP1.*

			longissimus dorsi		*gluteus medius*	
	N	LDL	C18:0	SAT	C18:0	SAT
TT	30	57.18^{A*}	11.26^{A}	36.52^{AB}	10.93^{AB}	36.18^{AB}
TC	162	61.55^{AB}	11.81^{B}	37.24^{B}	11.32^{B}	36.61^{B}
CC	137	65.94^{B}	11.60^{AB}	36.70^{A}	10.97^{A}	36.06^{A}

(*) superíndices distintos indican diferencias significativas $P<0.05$

CHARACTERIZATION OF THE PORCINE FATTY ACID TRANSPORT PROTEINS (SLC27a / FATPs solute carrier family 27a)

ABSTRACT: Long-chain fatty acids (LCFAs) contribute to many cellular functions including energy homeostasis and activation of nuclear transcription factors. However, to perform their diverse effects, LCFAs have first to traverse the plasma membrane, a process that can occur either through diffusion or be mediated by proteins. Fatty acid transport proteins (FATPs solute carrier family 27) are integral transmembrane proteins that enhance the uptake of long-chain fatty acids into cells. Although in humans six highly homologous FATPs proteins are found in practically all tissues, in the porcine species that information is limited. With the aim to increase the knowledge of these genes in pigs, different approaches have been followed. First, three partial fragments of FATP1 and FATP4 genes have been amplified and sequenced. Subsequently, we have used the clustalw software to identified polymorphisms in the porcine sequence. And finally, a preliminary association study was conducted identifying a polymorphism (FATP1c.491C>T) of FATP1 gene with significant effects in the relative distribution of stearic and saturated fatty acid levels in *longissimus dorsi* and *gluteus medius* muscles.
Keywords: *fatty acid transport proteins, FATP, solute carrier family 27a, pig*