ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS GENES DE LA APOLIPOPROTEÍNA D (*APOD*) Y *LOW DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR-RELATED PROTEIN 12* (*LRP12*) PORCINOS

Melo, C.[1], Zidi, A. [1], Quintanilla, R. [2] y Amills, M.[1]
[1] Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Bellaterra 08193 (Carola Melo: Carola.Melo@uab.cat). [2] IRTA Genètica i Millora Animal, 25198 Lleida.

INTRODUCCIÓN

La realización de un barrido genómico para caracteres relacionados con el metabolismo lipídico en una población Duroc (Gallardo et al., 2008) reveló la existencia de dos QTL significativos para las concentraciones séricas de triglicéridos a 190 días (SSC4, 43 cM) y de lipoproteínas de alta densidad (HDL) a 45 días (SSC13, 63 cM). En el presente trabajo se ha abordado la caracterización molecular de los genes candidatos *low density lipoprotein receptor-related protein* 12 (*LRP12*) y apolipoproteína D (*APOD*) que están comprendidos en los intervalos de confianza de los QTL SSC4 y SSC13, respectivamente. La APOD es una glicoproteína perteneciente a la familia de las lipocaínas (Drayna et al., 1986) y forma parte de las lipoproteínas de alta densidad (Mc Conathy et al., 1973), esencialmente vinculadas al transporte reverso de colesterol desde los tejidos hasta el hígado. La APOD se expresa de forma ubicua, aunque los niveles de expresión son particularmente elevados en los tejidos adiposo, conectivo y nervioso (Unigene Database). En humano, el gen *APOD* ha sido secuenciado en su totalidad y mapeado en el cromosoma 3q26.2qter (Strausberg et al., 2002). En el gen *APOD* humano se ha detectado tres sustituciones no sinónimas que presentan asociaciones con distintos parámetros relacionados con el metabolismo lipídico (Desai et al., 2002). En cuanto a la LRP12, es un miembro de la familia de receptores de moléculas LDL cuya función principal consiste en captar el colesterol circulante en plasma (Blacklow et al., 2007). El gen *LRP12* está localizado en el cromosoma humano 8q22 y codifica una proteína de 859 aminoácidos (http://www.ensembl.org).

MATERIAL Y MÉTODOS

Las extracciones de RNA se realizaron a partir de muestras de músculo estriado esquelético correspondiente a 8 individuos de la raza Duroc. Dichos individuos se escogieron en función de dos criterios (a) Pertenecer a la familia en la que segrega el QTL analizado y (b) Haber heredado alelos alternativos para dicho QTL (50% de los individuos portadores de cada uno de los alelos). Las muestras de tejido se congelaron en nitrógeno líquido, fueron homogenizadas con un politrón y el RNA se purificó mediante el preparado Trizol (Invitrogen). La síntesis de cDNA se llevó a cabo mediante transcripción reversa (RT) con el kit ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En el caso del gen *APOD*, los cebadores empleados en la reacción de amplificación fueron APOD-Fw; 5'-TCT CCA GCC ACC CAG CCC-3', APOD-Rv; 5'- CAG CAG GTC AGC AGC AAG TTT ATT-3', APO_Rv_intern_Sec; 5' TTT AGT GAG TAG TTG GCT TGG ATG-3'. Las condiciones de PCR fueron 1 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTP, 0.2 µM de cada cebador, 1 U de Taq DNA polimerasa (Eco Taq) y 2 µl de reacción RT en un volumen final de 25 µl. El perfil térmico fue de 94°C-1 min, 61°C-1 min, 72°C-2 min durante 30 ciclos.
En el caso del gen *LRP12*, los cebadores empleados en la reacción de amplificación fueron:

Fragmento 1: LRP12_Fw1; 5'- CTC CTC CTC TCT CCC TCC ATC-3' y LRP12_Rv1; 5'-ACA TAA TCA CCA TAA CCA GTA CCA TC-3'

Fragmento 2: LRP12_Fw2; 5'- TTC TCC CAA TTA TCC AGA CTT TTA T-3' y LRP12_Rv2; 5'-GGT GGA ATT AAA CCC TGA GC-3'

Fragmento 3: LRP12_Fw3; 5'- GCT TTA TTC TCT GAG AAT GTT TGA A-3' y LRP12_Rv3; 5'-GGT CTG GAG CAG TCA TTC AC-3'

Fragmento 4: LRP12_Fw4; 5'- TGG GTA CGT TTT ACA TTA GGG C-3' y LRP12_Rv4; 5'- GTT ACA AGA TGT ACT GGC AAA AGC-3'

Las condiciones de amplificación fueron 1.5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTPs, 0.5 µM de cada cebador, 0.625 U de Taq DNA polimerasa (Taq Gold) y 2 µl de reacción RT en un volumen final de 25 µl. El perfil térmico fue de 40 ciclos a 94°C-30 seg, 64°C-1 min, 72°C-1.30 min para el fragmento 1; 94°C-30 seg, 59°C-1 min, 72°C-1.30 min para el fragmento 2 y 94°C-30 seg, 61°C-1 min, 72°C-1.30 min para los fragmentos 3 y 4.
Los productos amplificados *APOD* y *LRP12* se secuenciaron utilizando el kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) y un aparato de electroforesis capilar ABI Prism 3730 Applied Biosystems)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se amplificó una región de 794 pb del gen *APOD* porcino que abarca la totalidad de la región codificante Dicha secuencia presentaba una similitud nucleotídica del 93%, 92%, 85% y 77% con las secuencias ortólogas de bovino, humano, ciervo y ratón. El análisis de la secuencia aminoacídica mediante el programa Scan Prosite (http://www.expasy.ch/tools/scanprosite) reveló la existencia de un dominio funcional lipocalina. Este dominio es característico de proteínas transportadoras de pequeñas moléculas hidrofóbicas como esteroides, retinoides y lípidos (Flower et al. 1993). El alineamiento de las distintas secuencias APOD porcinas generadas en el presente trabajo no permitió detectar ninguna posición polimórfica.
En cuanto al gen *LRP12* porcino, se amplificó una región de 2937 pb empleando cuatro pares de oligonucleótidos. El alineamiento de las 8 secuencias obtenidas mediante el programa Multalin permitió construir una secuencia consenso Dicha secuencia fue comparada mediante el programa Blast con las secuencias de genes ortólogos en otras especies, presentando una similitud nucleotídica del 96% y 92% con humano y ratón. La secuencia aminoacídica *LRP12* porcina fue analizada mediante el programa Scan Prosite. Cabe destacar que se detectaron cinco dominios *LDL-receptor class A,* ricos en cisteínas y típicos de los receptores de LDL. Asimismo, se hallaron cuatro polimorfismos nucleotídicos (SNP) sinónimos C516T, C771T, A780G y A1110G en la región codificante. Los SNP C516T, C771T, y A780G están localizados en el exón 4, mientras que A1110G se halla en el exón 5. Un objetivo futuro consistirá en realizar análisis de asociación entre dichos SNP y distintos caracteres vinculados al metabolismo lipídico con un especial énfasis en aquellos relacionados con las concentraciones séricas de lípidos

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado mediante los proyectos AGL2002-04271-C03 y AGL2007-66707-C02 (Ministerio de Ciencia e Innovación). Nuestro agradecimiento a la empresa Selecció Batallé por su inestimable contribución en la generación del material animal. Carola Melo ha recibido una beca otorgada por el Instituto Agronómico Mediterraneo de Zaragoza (IAMZ) y el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Blacklow, S.C. 2007. Versatility in ligand recognition by LDL receptor family proteins: advances and frontiers. Curr. Opin. Struct. Biol. 17: 419-426. • Desai, P.P., Bunker, C.H., Ukoli, F.A., Kamboh, M.I. 2002. Genetic variation in the apolipoprotein D gene among African blacks and its significance in lipid metabolism. Atherosclerosis. 163: 329-38. • Drayna, D., Fielding, C., McLean, J., Baer, B., Castro, G., Chen, E., Comstock, L., Henzel, W., Kohr, W., Rhee, L., Wion, K., Lawn, R. 1986. Cloning and expression of human apolipoprotein D cDNA. J. Biol. Chem. 261: 16535-16539. • Flowe, D.R., North A.C.T., Attwood T.K. 1993. Structure and sequence relationships in the lipocalins and related proteins. Protein Sci. 2: 753-761. • Gallardo, D., Pena, R., Amills, M., Varona, L., Ramírez, O., Reixach, J., Díaz, I.,

Tibau, J., Soler, J., Prat, J., Noguera, J. L., Quintanilla, R. 2008. Mapping of quantitative trait loci for colesterol, LDL, HDL and triglyceride serum concentrations in pigs. Physiological Genomics. 35: 199-209. • Strausberg, R.L., Feingold, E.A., Derge, J.G., Klausner, R.D., Collins, F.S., Wagner, L., Shenmen, C.M., Schuler, G.D., Altschul, S.F., Zeeberg, B. 2002. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. Proc Natl Acad Sci USA. 99: 16899-16903

MOLECULAR ANALYSIS OF THE APOLIPOPROTEÍN D (*APOD*) AND *LOW DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR-RELATED PROTEIN 12* (*LRP12*) GENES IN PIGS

ABSTRACT: In this work, we have characterized the variability of the low density lipoprotein receptor-related protein 12 (*LRP12*) and apolipoprotein D (*APOD*) genes in pigs. The porcine *LRP12* and *APOD* genes map to a QTL on SSC4 influencing serum triglyceride concentration at 190 days and to a SSC13 QTL with effects on high density lipoprotein (HDL) serum levels at 45 days, respectively. Sequencing of the coding region of pig *LRP12* showed that it encodes a protein with five cysteine-rich LDL-receptor class A domains that are typical of molecules binding LDL. We have also found four synonymous mutations at C516T, C771T, A780G and A1110G. Analysis of the pig APOD amino acid sequence evidenced the existence of a lipocalin domain typical of proteins binding small hydrophobic molecules. So far, we have not found any polymorphism in the pig *APOD* gene.
Keywords: *LRP12, APOD, pig, lipid, quantitative trait locus*