EL GEN *HMGCR* PORCINO: ESTUDIO ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE SU PROMOTOR

Cánovas, A.[1], Quintanilla, R.[1], Reecy, J.M.[2], Marqués, M.[3] y Pena, RN.[1]
[1]IRTA. Genètica i Millora Animal. Rovira Roure 191, 25198. Lleida.
[2]Iowa State University, Animal Science, 2255 Kildee Hall, 50011. Ames, IA, E.E.U.U.
[3]INDEGA, Universidad de León, Campus de Vegazana, 24071. León
angela.canovas@irta.cat

INTRODUCCIÓN

La **3-hidroxi-3-methilglutaril-coA reductasa (HMGCR)** es la enzima limitante en la síntesis *de novo* del colesterol, que convierte el HMG-CoA en mevalonato. Los inhibidores competitivos de la reductasa inducen la expresión de los receptores LDL en el hígado, aumentan el catabolismo de partículas LDL en plasma y reducen las concentraciones plasmáticas de colesterol, un importante factor en la etiología de la aterosclerosis.

A pesar del enorme interés de la especie porcina como modelo animal para el estudio de las enfermedades cardiovasculares en humanos (Lunney, 2007), existe un gran desconocimiento sobre la base genética del metabolismo del colesterol en porcino. En este trabajo hemos analizado estructural y funcionalmente el promotor del gen *HMGCR* porcino en relación a la variación de los niveles de lípidos plasmáticos en cerdos, mirando también su asociación con el engrasamiento y la cantidad y composición de la grasa intramuscular. Se ha realizado un estudio funcional adicional del gen *HMGCR* porcino, describiendo el nivel relativo de expresión en varios tejidos relacionados con la lipogénesis y estudiando la respuesta del promotor a varias sustancias activadoras o inhibidoras de su transcripción.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño experimental

El material animal utilizado en el presente estudio procede de una línea comercial Duroc con alto contenido de grasa intramuscular utilizada en la producción de jamón curado de calidad, y consta de una población de 350 cerdos castrados distribuidos en cinco familias de medios hermanos. Durante el periodo de cebo se registraron regularmente el peso y el espesor de grasa dorsal, y se tomaron dos muestras de sangre (a los 45 y 190 días de edad) en las que se midieron las concentraciones de colesterol, HDL, LDL y triglicéridos. Al sacrificio (sobre los 120 kg de peso vivo y 190 días de edad) se tomaron muestras de los músculos Longissimus Dorsi y Gluteus Medius sobre las que se midieron el porcentaje de grasa intramuscular y la composición en ácidos grasos.

Caracterización del promotor proximal; identificación y genotipado de polimorfismos

Para caracterizar el promotor proximal del gen *HMGCR* se amplificó un fragmento de 600 bp a partir de 20 ng de DNA genómico y un par de primers diseñados a partir de secuencias homólogas mediante Primer Express software (Applied Biosystem).

Construcción plásmidos y comprobación activadores / inhibidores

Preparamos dos construcciones híbridas con los dos alelos del SNP del promotor del gen *HMGCR* porcino seguido de una cassette de expresión con Luciferasa *Renilla.L*. Comprobamos la activación/inhibición de la expresión del gen *HMGCR* mediante la adición de diferentes tratamientos (insulina, colesterol, suero y forskolin) en las dos líneas celulares: HepG2 (células de carcinoma de hígado humano) y C2C12 (células de músculo de ratón). Los ensayos luciferasa se realizaron en el luminómetro TD-20/20 (Turner Designs).

Análisis de Expresión

Estudiamos la expresión del gen *HMGCR* en los 70 animales más extremos para parámetros de engrasamiento y calidad de carne, en músculo (mediante hibridación en un microchip de ADN porcino (*Affymetrix*)) y en hígado (mediante qPCR (ABI-7500)). Además, describimos por qPCR el nivel relativo de expresión del gen *HMGCR* porcino en varios tejidos relacionados con la lipogénesis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización del promotor proximal del gen *HMGCR*

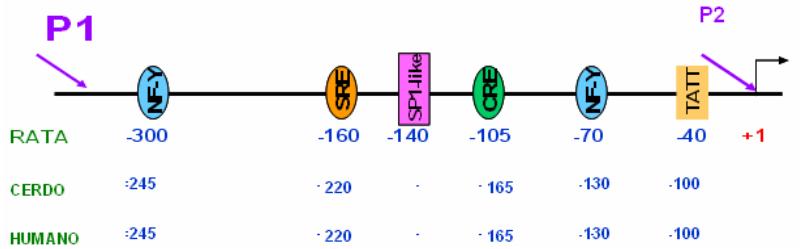


Figura 1. *Posición de elementos reguladores en promotores HMGCR*

El análisis de la región promotora amplificada indicó que el promotor del gen *HMGCR* muestra un alto grado de conservación (entre el 75 y el 88%) con los promotores de otros mamíferos (*Bos taurus*, *Homo sapiens*, *Mus musculus* y *Rattus norvegicus*). Es más, la localización de las zonas de unión potenciales a los factores de transcripción CREB, NF-Y y SRE estan conservadas respecto el promotor humano y de rata (Figura 1).

También identificamos dos polimorfismos tipo SNP (P1/P2 en la Figura 1) cuyo análisis *in silico* reveló que el primero de ellos afecta a una posible secuencia diana para factores de transcripción de la familia bHLH de reguladores de la miogénesis, mientras que la segunda mutación afecta a la secuencia consenso para el factor de transcripción Ets-2. La unión de ambos factores de transcripción al promotor *HMGCR* no ha sido demostrada todavía en ninguna especie.

Actividad transcripcional del promotor HMGCR porcino

De los cuatro reactivos testados, la insulina y la reducción del porcentaje de suero dieron lugar a la activación del promotor HMGCR porcino por encima de los niveles basales. En cambio, el 25-hidroxicolesterol y el forskolin ejercían una fuerte inhibición de la actividad de este promotor.

También estudiamos la actividad transcripcional asociada a los diferentes polimorfismos encontrados en el promotor proximal del gen *HMGCR* porcino en diferentes condiciones de activación / inhibición. En las células C2C12 y HepG2 transfectadas observamos que la insulina (1µM) activaba más el promotor *HMGCR* porcino en el alelo G, mientras que el 25-hidroxicolesterol (12.5µM) inhibía más la actividad en el alelo G.

Correlación entre expresión y caracteres de calidad de la carne

Estudiamos la correlación entre la expresión analizada en músculo e hígado y diversos medidas de lípidos plasmáticos, engrasamiento y cantidad y composición de la grasa intramuscular, obteniendo una asociación significativa de la expresión en músculo con los triglicéridos y el colesterol HDL y LDL séricos, el porcentaje de magro y de grasa intramuscular, y el contenido en ácidos oleico, linoleico, esteárico y palmítico. Por el

contrario, los niveles de expresión en hígado tan solo mostraron una asociación significativa con el colesterol HDL plasmático, el porcentaje de magro y contenido en ácido esteárico.

En músculo, la expresión del gen *HMGCR* fue mayor en el grupo de animales con valores altos para parámetros lipídicos que en el grupo con valores bajos ($p<0.001$), mientras que en hígado los dos grupos no difirieron en los niveles de expresión de este gen.

Perfil de expresión del gen *HMGCR* porcino

Hemos investigado la expresión relativa del gen *HMGCR* en seis tejidos lipogénicos de cerdo adulto (hígado, grasa subcutánea, músculo *gluteus medius* (GM), músculo *longissimus dorsi* (LD), corazón y duodeno). Los resultados indican que la expresión máxima se obtiene en grasa y duodeno, mientras que corazón e hígado presentan niveles inferiores de expresión.

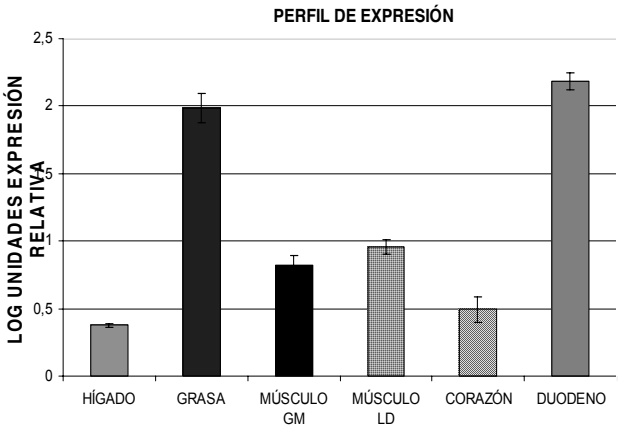


Figura 2. *Perfil de expresión del gen HMGCR porcino.*

CONCLUSIÓN

El gen HMGCR juega un papel importante en la variabilidad genética del metabolismo lipídico y del colesterol en porcino, mostrando además una asociación con la cantidad y composición de la grasa intramuscular, presentándose así como un posible gen candidato para la mejora genética de la calidad de carne.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Davis et al. 1995 J Anim Science 73:310. • Tong et al. 2004. Lipids 39:239-341. • Zhang et al. 2007. J Anim Sci.85:583-591. Lunney 2007. Int J Biol Sci 3:179.

Agradecimientos: Este proyecto ha sido financiado por el MEC (GEN2003-20658-C05-05 y AGL2007-66707-C02-01). Agradecemos a D. Almuzara su apoyo técnico y a Selección Batallé su cooperación en la obtención del material animal. A. Cánovas disfruta de una beca pre-doctoral INIA.

THE PIG *HMGCR* GENE: STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STUDY OF THE PROXIMAL PROMOTER

ABSTRACT: HMGCR is the rate-limiting enzyme in the biosynthesis of cholesterol. We have studied the role of the *HMGCR* gene in pig lipid metabolism by means of expression and structural analysis. *In vitro* studies in liver- and muscle-derived cells indicated that *HMGCR* promoter contains elements which drive response to insulin, sterols and growth factors. Comparison of expression in several tissues showed that *HMGCR* expression was maximal in fat and duodenum and lowest in liver. Moreover, muscle (but not liver) expression correlated with several fattness, growth and meat quality traits, indicating that *HMGCR* may play an interesting role in the genetic variability of lipid and cholesterol metabolism in pigs.
Key words*: pig, meat quality, gene expression, cell culture.*