VARIABILIDAD DE LOS GENES DEL COLOR DE LA CAPA EN EL GANADO CAPRINO

Badaoui, B. [1], Capote, J. [2], Jordana, J. [1], Ferrando, A. [1], Vidal, O. [3], Martínez, A. [4], Delgado, J. V. [4], D'Andrea, S. [5], Pilla, F. [5] y Amills, M[1].

[1] Departament de Ciencia Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193; [2] Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, La Laguna 38108, Tenerife; [3] Departament de Biologia, Universitat de Girona, Girona 17071; [4] Departamento de Genética, Universidad de Córdoba, Córdoba 14071; [5] Dipartimento Scienze Animali Vegetali e dell'Ambiente, Università degli Studi del Molise, Campobasso, Italia.

E-mail de contacto: Bouabid.Badaoui@uab.cat

INTRODUCCIÓN

La pigmentación de la capa en mamíferos depende fundamentalmente del número de melanocitos y de sus niveles de actividad melanogenica (Sturm et al., 2001). Existen dos tipos de melanina: la eumelanina, que da lugar a capas negras o marrones, y la feomelanina asociada a capas rojas o amarillentas (Sturm et al., 2001). Cuando la actividad de la tirosinasa es elevada se favorece la síntesis de eumelanina, mientras que en el caso contrario se sintetiza preferentemente feomelanina (Sturm et al., 2001). A su vez, la actividad de la tirosinasa está regulada a través de la unión de la hormona estimulante del melanocito α (MSH) al receptor de la melanocortina 1 (MC1R), fenómeno que favorece una mayor actividad de la tirosinasa y por tanto da lugar a la síntesis de eumelanina. En bovino, el gen *MC1R* tiene tres alelos E^D (capa negra), E^+ (capa marrón) y e, que da lugar a una capa roja (Seo et al., 2007). Por otra parte, el gen Agouti-signaling protein (*ASIP*) es responsable de la síntesis de una molécula que compite con la MSH para unirse con MC1R (Jackson, 1994). La unión de ASIP a MC1R da lugar a la síntesis de feomelanina (Sturm et al., 2001). En bovino, el gen *ASIP* regula la distribución de la pigmentación dorsal y ventral (Seo et al., 2007) mientras que en ovino la duplicación del gen *ASIP* está asociada a la capa de color blanco (Norris y Whan, 2008). Finalmente, las proteínas 1 y 2 relacionadas con la tirosinasa (TYRP1 y TYRP2) desempeñan una función importante en el proceso de la melanogenesis (Jackson, 1994). En ovino se ha demostrado que la sustitución C290F en la proteína TYRP1 tiene un importante efecto sobre el color de la capa (Gratten et al., 2007). Con el objetivo de abordar el estudio de la determinación del color de la capa en ganado caprino, se ha procedido a caracterizar el polimorfismo de los genes *MC1R*, *ASIP* y *TYRP1* en distintas poblaciones caprinas españolas e italianas.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Recogida de muestras y extracción de RNA total y DNA genómico

Se ha realizado la extracción de DNA genómico de muestras de pelo/sangre, procedentes de cabras con distintos orígenes y capas, mediante el kit *DNeasy Blood and Tissue* (Qiagen). Concretamente, se han analizado individuos de las razas Murciano-Granadina, Malagueña, Payoya, Palmera, Majorera, Tinerfeña, Garganica, Jonica, Maltesa, Derivata di Siria, Girgentana y Saanen. Por otra parte, se ha realizado extracciones de RNA total a partir de muestras de piel de cabras Palmeras y Tinerfeñas. Dichas muestras han sido conservadas en RNA-later (Applied Biosystems) a una temperatura de -20 °C. La extracción de RNA total se ha llevado a cabo mediante el kit *RiboPure* (Ambion). La síntesis de DNA complementario se ha realizado con el kit *Thermoscript RT-PCR System* (Invitrogen). Se ha empleado un equipo Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) para estimar la cantidad y calidad del RNA total, así como un equipo Nanodrop ND1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) para cuantificar el DNA genómico.

2. Detección de polimorfismos en los genes *MC1R, TYRP1* y *ASIP*

Se ha amplificado por PCR prácticamente la totalidad de la región codificante de los genes *MC1R*, *TYRP1* y *ASIP* mediante cDNA sintetizado a partir de RNA de muestras de piel correspondientes a 8 cabras de origen canario (4 de color negro y 4 de color blanco). En

paralelo, se procedió a amplificar, a partir de muestras de DNA genómico, la región codificante y determinadas regiones intrónicas de los tres genes anteriormente citados, empleando para ello un mínimo de cinco individuos de distintas razas y coloraciones. Las condiciones de amplificación y las secuencias de los primers pueden solicitarse al autor responsable de la comunicación. La purificación de la PCR se llevó a cabo mediante el kit *Exo-SAP-IT* (GE Healthcare) después de lo cual se realizó la reacción de secuenciación con el *BigDye Terminator v1.3 Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystems). Las reacciones de secuenciación fueron purificadas mediante el kit *Sequencing Reaction Cleanup* (Millipore) y analizadas con el programa *Sequencing Analysis* (Applied Biosystems).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un resumen de los resultados obtenidos puede observarse en la Tabla 1. Concretamente, se ha identificado 7 polimorfismos en la región codificante del gen *MC1R*, de los cual 5 son mutaciones no sinónimas. Resulta interesante observar que uno de los polimorfismos genera un codón stop, además, cuatro de los polimorfismos no sinónimos implican la sustitución de un aminoácido por otro de características bioquímicas muy distintas (Lys226Glu y Val249Phe, Gly255Asp, Cys267Tyr). En el gen *ASIP* se ha identificado dos polimorfismos no sinónimos en el exón 3, mientras que en los intrones 1 y 2 se ha detectado dos polimorfismos adicionales. Aunque el análisis de unos pocos individuos apunta al hecho de que los dos polimorfismos no sinónimos tienen efectos sobre el color de la capa, ello debe confirmarse mediante el genotipaje de un número suficiente de individuos. Finalmente, en el gen *TYRP1* se ha hallado dos polimorfismos sinónimos en el exón 6 y 16 polimorfismos en el intrón 2. Actualmente, se está procediendo a genotipar, en un panel de cabras de distintas razas, los diversos polimorfismos no sinónimos caracterizados en el presente trabajo para determinar su asociación con el color de la capa.

Tabla 1. *Polimorfismos de los genes relacionados con el color de la capa en caprino*

Gen	Polimorfismo	Localización	Naturaleza	Análisis in silico*
MC1R	T/C	Exón 1	Sinónimo	-
	C/T	Exón 1	No-sinónimo (Ala81Val)	0.5
	C/T	Exón 2	Codón stop	-
	A/G	Exón 2	No-sinónimo (Lys226Glu)	0.5
	G/T	Exón 2	No-sinónimo (Val249Phe)	0.95
	G/A	Exón 2	No-sinónimo (Gly255Asp)	0.95
	C/G	Exón 2	No-sinónimo (Cys267Try)	0.86
ASIP	T/G	Exón 3	No-sinónimo (Cys126Gly)	0.83
	T/G	Exón 3	No-sinónimo (Val128Gly)	0.57
	G/T	Intrón 1	-	-
	G/A	Intrón 2	-	-
TYRP1	A/G	Exón 6	Sinónimo	-
	A/G	Exón 6	Sinónimo	-
	16 polym	Intron2	-	-

* Un valor > 0.90 indica una elevada probabilidad de que se produzca una alteración funcional, según el programa Panther (Brunham et al. 2005)

Agradecimientos: El presente trabajo se ha financiado mediante los proyectos de conservación de recursos zoogenéticos RZ2007-00005-C02-01 y RZ2007-00005-C02-02 concedidos por el INIA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Brunham et al. 2005. PLoS Genet 1:739-747. • Feng et al. 2009. Biochem. Genet (in Press). • Gratten et al., 2007. Proceedings of the Royal Society 274:619–626. • Jackson 1994. Annual Review of Genetics 28:189–217. • Norris & Whan 2008.Genome Res 18:1282-1293. • Seo et al. 2007. Veterinary Dermatology 18:392–400. • Sturm et al. 2001. Gene 277:49-62.

VARIABILITY OF COAT COLOR GENES IN GOATS

ABSTRACT: Pigmentation genes such as *MC1R* (melanocortin receptor 1), *ASIP* (agouti-signaling protein) and *TYRP1* (tyrosinase-related protein 1) play a major role in determining coat color in mammals. With the aim of gaining new insights into the genetic factors that regulate coat color in goats, we have sequenced most of the coding region of the *MC1R*, *ASIP* and *TYRP1* genes in a panel of goat breeds exhibiting different coat colors. Sequence analysis revealed seven polymorphisms in the *MC1R* gene of which five are non-synonymous (Ala81Val Lys226Glu, Val249Phe, Gly255Asp and Cyst267Try)) and one is a nonsense substitution. In the *ASIP* gene, we found two non-synonymous mutations (Cys126Gly and Val128Gly). Two silent SNP have been found in the coding region of the *TYRP1* gene. Furthermore, sixteen SNP were detected at intron 2 of *TYRP1*. Currently, we are genotyping these polymorphisms in a panel of goats from different breeds and coat colors.
Keywords: *MC1R*, *ASIP*, *TYRP1,* pigmentation, caprine