VARIABILIDAD NUCLEOTÍDICA DEL GEN *CORTISOL BINDING GLOBULIN* (CBG)

Esteve, A.[1], Ojeda, A.[1], Folch, J.M.[1] y Pérez-Enciso, M.[1, 2]
[1] Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra.
[2] Institut Català de Recerca i Estudis Avançats, C/ Lluis Companys 23, 08010, Barcelona.
E-mail: anna.esteve@uab.cat

INTRODUCCIÓN

El gen cortisol binding globulin (*CBG*), también conocido como serpina 6, es una alfa-globulina de la superfamilia de las serpinas (*serpin peptidase inhibitor*). La proteína se fabrica en el hígado y se libera en la sangre, su principal función es unirse y transportar glucocorticoides como el cortisol. El gen CBG se localiza, en porcino, en el cromosoma 7 próximo al SLA. Estudios previos de Ousova et al. (2004) han mostrado la importancia de este gen en la sensibilidad al estrés en porcino, así como su implicación en la obesidad. Recientemente, Guyonnet-Dupérat et al (2006) identificaron una mutación no sinónima, Arg307Gly, en el exón 4 de dicho gen y que, según los autores, estaría íntimamente asociada con la capacidad de unión de la proteína al cortisol y con la calidad de la carne. El objetivo de este trabajo fue analizar la variabilidad de este gen en un panel de diversas razas porcinas y jabalí, a efectos de determinar si el patrón de diversidad nucleotídica era compatible con un proceso selectivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material animal

Se secuenció parcialmente el gen en 21 animales: 3 Duroc (España y USA), 1 Large White (Finlandia), 1 Landrace (España), 1 Tamworth (UK), 1 British Lop (UK), 1 Ibérico Guadyerbas, un animal de raza desconocida de Cabo Verde, 1 Vietnamita, 1 Meishan, 1 Jianxin Black, 1 Jinhua, 1 Huai, éstas últimas razas chinas, así como 4 jabalíes occidentales (Túnez, España e Italia), y uno de China. Como outgroup, se secuenció un Babirusa.

Identificación de polimorfismos

A partir de la secuencia pública del BAC porcino del cromosoma 7 (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_scrofa/) se localizó la posición del gen *CBG* porcino. Se diseñaron 6 pares de cebadores para amplificar por PCR un total de aproximadamente 6 kb. La región 1 (~1kb) abarca parte de la 5' flanqueante del gen, el exón 1 y parte del intrón 1. La región 2 (~1kb) comprende parte del intrón 2, el exón 3 y parte del intrón 3. La región 3 (~4 kb) incluye parte del intrón 3, el exón 4, el intrón 4, el exón 5 y parte de la región 3' flanqueante del gen. Los fragmentos amplificados fueron purificados y posteriormente secuenciados mediante *BigDye Terminator* v3.1 *Ready Reaction Cycle Sequencing Kit* en un secuenciador ABI PRISM 3730 (*Applied Biosystems*). El análisis de las secuencias e identificación de polimorfismos se realizó mediante el programa *SeqScape* v2.5 (*Applied Biosystems*).

Análisis estadístico y genético

A partir de las secuencias se reconstruyeron las fases mediante el programa *Phase* v2.1.1 (Li and Stephens 2003) usando las opciones por defecto, excepto que el programa corrió 5 veces y la última interacción fue 10 veces más larga, tal y como sugieren los autores. El índice de diversidad nucleotídica (π), Tajima's D test, Fu and Li test y el HKA test fueron estimados con el DnaSP v4.5 (Rozas *et al*. 2003). Se realizó un árbol filogenético NJ mediante el modelo Kimura de dos parámetros usando Mega4.1 (Kumar et al. 2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se han detectado un total de 164 polimorfismos: 147 SNP (incluyendo 18 *singletons*) y 17 *indels* en un total de 5919 pb, esto es, un promedio de un polimorfismo cada 36 pb. De éstos, 21 se

localizaron en exones, 135 en intrones, ninguno en la región 5' flanqueante del gen, y 8 en la región 3' flanqueante del gen. Se encontraron 6 cambios de aminoácido no sinónimos (Tabla 1 y Tabla 2). Algunas de las indels encontradas son bastante largas, de hasta 40 nucleótidos y algunas albergan SNP en su secuencia, además muchas se presentaban en heterozigosis, lo que dificulta el análisis.

Algunos estadísticos están en la Tabla 3. La diversidad nucleotídica (π) de la población europea (incluyendo las razas internacionales y de jabalí) fue de 0,14% para el conjunto de la región secuenciada, mientras que para la población asiática fue 0,96%, lo que indica mucha más variabilidad en Asia que en Europa. Comparando las diversidades nucleotídicas de los cerdos domésticos europeos versus los jabalíes europeos encontramos que éstas fueron 0,17% y 0,04%, respectivamente, observando muy poca variabilidad en estos últimos. Se realizó el test HKA comparando la región 1 del gen con las regiones intrónicas y se obtuvo un resultado significativo, indicando que las regiones están sometidas a presiones evolutivas diferentes.

La Figura 1 muestra un árbol filogenético NJ con los haplotipos de la región 3 que contiene la mutación Arg307Gly descrita. Es evidente la divergencia profunda entre orígenes geográficos (Asia vs. Europa), aunque el animal Landrace (LRES0520) presenta un haplotipo de cada origen, mostrando una vez más la introgresión de germoplasma asiático que se produjo en las razas occidentales. Pero en este caso es áun más interesante hacer notar la posición de los haplotipos con la mutación potencialmente causal. En primer lugar, sólo se observan en haplotipos europeos que, además, presentan muy poca variabilidad. En segundo lugar, no lo hemos observado en jabalí y, en cambio, está a una alta frecuencia en las razas europeas, excepto en cerdo Ibérico. La mutación está presente en razas tan dispares como Tamworth o Landrace.

En conclusión, la diversidad nucleotídica de la especie porcina es muy elevada, casi del 1% en regiones intrónicas en promedio, y hasta 1.6% en el intrón 2. La mayor parte de esta diversidad es de origen asiático. En lo que respecta a la mutación descrita por Guyonnet-Dupérat et al. (2006), ésta es de origen europeo muy reciente, posiblemente apareció después de la domesticación. El hecho de que esté a frecuencia tan elevada en las razas europeas podría ser debido a un barrido selectivo pero, sin embargo, no se aprecia una disminución de variabilidad entre los haplotipos con y sin la mutación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFÍCAS

● Ousova et al. 2004. *Mol Endocrinol* 18(7):1687-96 ● Guyonnet-Dupérat et al. 2006. *Genetics*.173(4):2143-9 ● Rozas et al. 2003. *Bioinformatics 19, 2496-2497* ● Li, N. & M. Stephens. 2003. *Genetics* 165, 2213-33 ● Kumar et al. 2004. *Brief Bioinform* 5, 150-63.

Agradecimientos: Agradecemos a los diversos colegas e instituciones que nos suministraron muestras para este estudio. Trabajo financiado por el MICINN a través del proyecto AGL2007-65563-C02-01/GAN y de becas FPI a Anna Esteve y Ana Ojeda.

NUCLEOTIDE VARIABILITY OF THE CORTISOL BINDING GLOBULIN (CBG) GENE

ABSTRACT: We report nucleotide diversity in cortisol binding globulin, an obesity candidate gene in porcine, by partial resequencing of 20 Asian and European pigs and wild boars. We found a high π (0.68% on average), and was much higher in Asia than in western populations. We also report that the non synonimous aminoacid change Arg307Gly, described by Guyonnet-Dupérat et al. as associated with meat quality and cortisol levels, was only detected in European domestic pig breeds.

Keywords: *nucleotide variability, domestication, serpina 6, pig.*

Tabla 3. *Variabilidad nucleotídica de los exones, intrones y regiones flanqueantes, número medio de diferencias entre secuencias y resultados de los estadísticos Tajima's D y FuLi tests.*

Dominio	Π (%)	AvNumDif	TajimaD	FuLiD*
5' flanqueante (428 bp)	0	0	n.d.	n.d.
3' flanqueante (742 bp)	0.18	1.34	-0.82	0.63
exón 1	0	0	n.d.	n.d.
exón 3	0.75	2.04	-0.10	0.11
exón 4	0.32	0.47	1.41	0.56
exón 5	0.44	1.95	-0.75	0.90
regiones exónicas (933 bp)	0.48	4.45	-0.33	0.68
parte intrón 1	0.13	0.61	-1.22	0.19
parte intrón 2	1.61	9.19	0.90	0.84
parte intrón 3	0.84	10.51	-0.10	0.70
parte intrón 4	0.97	13.61	0.33	1.47
regiones intrónicas (3816 bp)	0.91	33.92	0.25	1.11
Total (5919 bp)	0.68	39.72	0.11	1.08

Tabla 1 y Tabla 2. *Cambios aminoacídicos no sinónimos encontrados, y muestras que los presentan.*

	Muestras que presentan los cambios no sinónimos	
Exón 3		
(1) HIS→TYR	WBES0007 (4)	DUUS0602 (4)(5)
(2) GLY→ARG	DUES0304 (2)(4)(5)	JBCN0672 (3)
(3)THR→MET	LWFN0343 (4)(5)	WBIT0761(4)
(4) VAL→I LE	TWGB0372 (4)(5)	WBIT0781 (4)
Exón 4	BLGB0373 (4)(5)(6)	NACV0908 (4)(5)
(5) ARG→GLY	IBES0415 (4)	WBIT0966 (4)
Exón 5	LRES0520 (1)(5)	DUES0998 (4)(5)
(6) MET→I LE		

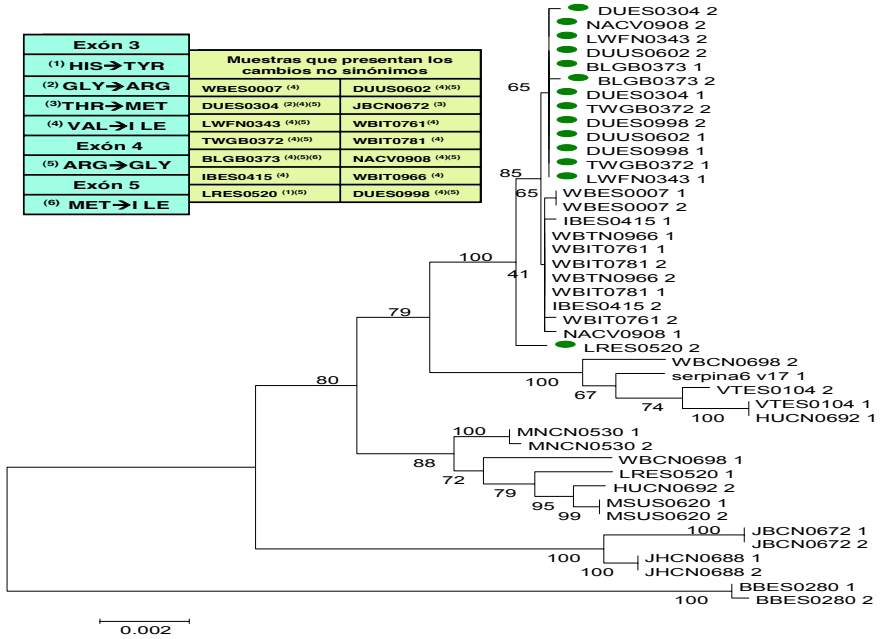


Figura 1. *Árbol filogenético NJ (Mega 4.1) elaborado con los haplotipos de la región 3 del gen cbg. Se ha marcado con un círculo aquellos haplotipos que presentan el cambio de aminoácido no sinónimo descrito por Guyonnet-Dupérat et al (2006).*