

ELECCIÓN Y MAPEO DE GENES CANDIDATO SUBYACENTES A DOS QTL PARA TAMAÑO DE CAMADA DETECTADOS EN EL CROMOSOMA 12 PORCINO

Fernández, A.¹, Fernández, A.I.¹, Rodríguez, C.¹, Tomas, A.²

Estellé, J.², Noguera, J.L.³, Óvilo, C.¹

¹Dpto. Mejora Genética Animal, SGI-T-INIA, 28040 Madrid; ²Dpto. Ciència Animal i dels Aliments, UAB. Bellaterra; ³Genética y Mejora Animal, IRTA-Lleida, 25198 Lleida
E-mail: amanda@inia.es

INTRODUCCIÓN

En producción animal, caracteres relacionados con la fisiología reproductiva, tales como prolificidad y fertilidad tienen una elevada importancia económica. A través de programas de selección y mejora genética cuantitativa se ha logrado una moderada ganancia genética respecto a este tipo de caracteres. Sin embargo, un mejor conocimiento de su arquitectura genética puede brindar nuevas y complementarias herramientas utilizables a través de selección asistida por genes o por marcadores (Dekkers, 2004).

En la especie porcina, el carácter prolificidad es complejo, de baja heredabilidad y con una fuerte heterosis (Rothschild y Bidanel, 1998). Hay pocos trabajos de detección de QTL para este carácter en esta especie, y los que existen no presentan resultados consistentes (Spötter y Distl, 2006). Sin embargo, Noguera *et al.* (2007) al realizar el barrido genómico de un cruce F₂ entre dos razas muy divergentes para este carácter (Ibérico y Meishan) han puesto de manifiesto que la arquitectura genética de la reproducción en cerdos es un complejo sistema de interacciones génicas, detectando QTL aditivos altamente significativos a nivel genómico ($P < 0.01$) para el número de lechones nacidos vivos y totales en los cromosomas SSC17 y SSC13, además de QTL epistáticos para estos caracteres en los cromosomas 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15 y 18.

El objetivo del presente trabajo fue realizar una selección y posterior análisis de genes candidato subyacentes a los QTL epistáticos para el tamaño de camada, localizados en los intervalos 8-19cM (QTL1) y 74-96 cM (QTL2) del cromosoma SSC12, en el material biológico del citado cruce experimental.

MATERIAL Y MÉTODOS

La selección de genes candidato se realizó en base a tres criterios. El primero fue la posición del gen candidato en la especie porcina dentro de los intervalos de confianza de los QTL1 o QTL2 del SSC12. Para ello se usó el mapeo comparativo humano - cerdo (www.cabnr.unr.edu/beattie/research/second_generation.htm). El segundo criterio fue la funcionalidad del gen, utilizando la información de las bases de datos de humano y ratón, OMIM (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM) y Mammalian Phenotype Ontology (www.informatics.jax.org/), respectivamente. El tercero fue la existencia de interacciones génicas o proteínicas descritas; para lo que se hizo uso de la información contenida en la base de datos String (www.string.embl.de).

Para llevar a cabo el mapeo físico de los genes candidato propuestos se realizó una búsqueda de secuencias porcinas en los archivos "Traza" (www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces), partiendo de las secuencias referencia en las especies humana y ratón. A partir de las secuencias porcinas, se diseñaron parejas de oligonucleótidos (Nos2aRh, Slc9a3r1Rh, AKAP1Rh, CRHR1Rh e IGF1BP1Rh, Tabla 1) que permitieron la amplificación específica en el panel ImpRH del INRA-Toulouse (Milan *et al.*, 2000). Las reacciones de amplificación se realizaron en volúmenes finales de 15 µl conteniendo 0.2 mM dNTPs, 2mM MgCl₂, 0.5 µM de cada oligo, 1X Buffer de PCR, 1 U Taq polimerasa (TTh, Biotools) y 40 ng de ADN de cada uno de los 118 clones del panel. Las condiciones de amplificación fueron de 94°C durante 5 min, seguido de 30 ciclos con 94°C durante 30s, T_A (mostrado en la tabla1) durante 30s y 72°C durante 30s, y una extensión final a 72°C durante 5 min.

Tabla1. Secuencia de las parejas de oligonucleótidos, T_A y tamaño de los fragmentos (pb)

Nombre	Forward 5'→3'	Reverse 5'→3'	T _A	Tamaño
Nos2aRh	ggcgccggggcgagtgtat	ggcctggcattgtggatttagt	59	197
Slc9a3r1Rh	acaccccagcttatcccctcctt	tcgagatgttgctgagtcct	57	306
AKAP1Rh	gcaatcacacctcccgcctcagtc	agatgacgtggggtgtgggaaaagtc	57	186
CRHR1Rh	gaagtgggggagaaaggctggagaa	gtggcgtgggggatgggagag	62	310
IGF2BP1Rh	ctagagccggggtgggggatgg	ggcgcctgggaggcgga	64	420

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dentro de los intervalos de confianza de los QTL detectados hemos propuesto una colección de cinco potenciales genes candidato, funcionales y posicionales estimados a través del mapeo comparativo humano-cerdo:

- Genes candidato para QTL1 (8-19 cM):

- Gen *Slc9a3r1*, localizado en el cromosoma humano 17 (17q25-1). La proteína codificada por este gen es un intercambiador sodio / hidrógeno. Mutaciones en este gen se han asociado con una disminución del tamaño de camada en ratón (Shenolikar *et al.*, 2002).

- Genes candidato para QTL2 (74-96 cM):

- Gen *AKAP1*, localizado en el cromosoma 17 humano (17q21-23). La proteína codificada por este gen, quinasa de anclaje tipo 1, se supone implicada en la ruta de transducción de señales dependientes de AMPc y encargada de dirigir ARN a compartimentos celulares específicos. Estudios realizados en ratón determinan asociación de determinadas variantes del gen con una reducción en el tamaño de camada (Newhall *et al.*, 2006).

- Gen *CRHR1*, localizado en el cromosoma 17 humano (17q12-q22). Este gen codifica para una proteína receptora de la hormona relacionada con la corticotropina, potente mediador endocrino durante la gestación (Klimaviciute *et al.*, 2006).

- Gen *IGF2BP1*, localizado en el cromosoma 17 humano (17q21-32). Este gen codifica para una proteína de unión al factor de crecimiento IGF2, regulando la traducción de este mismo factor. Se han detectado diferencias de expresión de su transcrito durante la implantación fetal y el desarrollo del blastocisto (Moreira *et al.*, 2006).

- Gen *Nos2a*, localizado en el cromosoma 17 humano (17q11.2-12). Este gen codifica para la sintasa 2 de óxido nítrico. El óxido nítrico participa de la señalización molecular de múltiples procesos celulares que ocurren durante la gestación. Además, diversos estudios realizados en ratón y rata han relacionado variantes de este gen *Nos2a* con una reducción en el tamaño de camada (Burnett *et al.*, 2002).

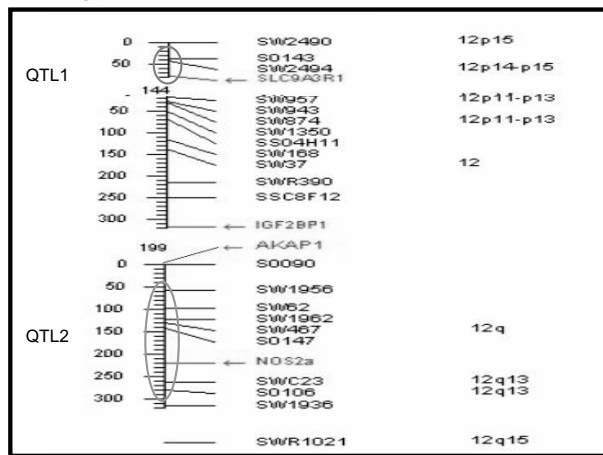
Ya que estos genes no estaban descritos en la especie porcina y por tanto, tampoco se conocía la localización exacta de los mismos, exclusivamente una estima de su posición por mapeo comparativo con la especie humana, se procedió a realizar el mapeo físico de los mismos utilizando un panel de células híbridas irradiadas con el objetivo de comprobar su coincidencia dentro de los intervalos de confianza de los QTL. Para realizar este mapeo se requiere un conocimiento mínimo de la secuencia porcina, por lo tanto se procedió a la caracterización de pequeños fragmentos de estos genes porcinos que permitiesen el diseño de oligonucleótidos específicos. Se consiguieron amplificar cinco fragmentos de 197 pb, 306 pb, 186 pb, 310 pb y 420 pb, correspondientes a cada uno de los cinco genes porcinos a mapear, *Nos2a*, *Slc9a3r1*, *AKAP1*, *CRHR1* e *IGF2BP1*, respectivamente.

El resultado del mapeo físico aparece representado en la Figura 1. Cuatro de los cinco genes fueron mapeados con éxito en el cromosoma 12 porcino, sin embargo el quinto de ellos, *CRHR1*, apareció localizado en el cromosoma 7, en la misma región donde parece estar localizado el gen *CRHR2*, gen que comparte una elevada similitud con el anterior (82%), especialmente en la zona donde se diseñó la pareja de oligonucleótidos, por lo que nuestra hipótesis es que el gen mapeado fue *CRHR2*.

Respecto a los cuatro genes mapeados con éxito en el cromosoma 12, dos de ellos *AKAP1* e *IGF2BP1* parecen estar localizados bastante alejados de los intervalos de confianza tanto

del QTL1 como del QTL2. Sin embargo, el gen *Slc9a3r1* aparece localizado dentro del intervalo del QTL1 (LOD:12.61 y Frac. Retención: 23%), intervalo aproximadamente delimitado por los marcadores *SW2494* y *SW874*. El mapeo del gen *Nos2a* también parece confirmar la posición del mismo dentro del intervalo del QTL2 (LOD: 9.84 y Frac. Retención: 29%), delimitado aproximadamente por los marcadores *SW 1956* y *SWR1021*. No consideramos necesario el intento de localizar de nuevo el gen *CRHR1* ya que, según la posición descrita en la especie humana, este gen en la especie porcina estaría en la misma región donde han quedado localizados los genes *IGF2BP1* y *AKAP1*, es decir alejados de los intervalos de los QTL.

Figura 1. Mapa físico del cromosoma porcino SSC12 (ImpRH)



Como resultado del mapeo físico, hemos reducido la colección de genes candidato propuesta, de cinco a dos, *Nos2a* y *Slc9a3r1*. Un estudio llevado a cabo por Glynne *et al.* (2002), muestra la existencia de interacción entre ambas proteínas codificadas por estos genes para la correcta localización celular y función de iNOS (sintasa de óxido nítrico inducible). Este resultado permite establecer ambos genes, *Nos2a* y *Slc9a3r1*, como firmes candidatos a ser responsables de los QTL epistáticos detectados en el cromosoma SSC12 para el carácter tamaño de camada en el cruce Ibérico x Meishan.

El trabajo que se está llevando a cabo en este momento implica la caracterización de ambos genes, ya que no están descritos en la especie porcina. Además, el análisis de su secuencia nucleotídica y comparación de la misma en el material del cruce Ibérico x Meishan, permitirá identificar polimorfismos informativos con el objetivo de localizar éstos dentro del mapa de ligamiento disponible para este material. Una vez confirmado la posición de ambos genes, se procederá a la búsqueda de la /s mutaciones candidatas a ser responsables de los QTL detectados.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Burnett, T.G. *et al.* 2002. *Reproduction* 124, 49-57.
- Dekkers, J.C.M. 2004. *J. Anim. Sci.* 82 (E. Suppl.) E313-E328.
- Glynne, P.A. *et al.* 2002. *J Biol Chem.* 277, 33132-33138.
- Klimaviciute, A. *et al.* 2006. *Rep Biol Endocrin.* 4, 29.
- Moreira, P.N. *et al.* 2006. *Zygote* 14, 81-87.
- Newhall, K.J. *et al.* 2006. *Curr Biol.* 16, 321-327.
- Noguera, J.L. *et al.* 2007. *Enviado a Genome Res.*
- Rothschild, M.F. y Bidanel, J.P. 1998. In: *The Genetics of the Pig.* pp. 313-343.
- Shenolikar, S. *et al.* 2002. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 11470-11475.
- Spötter, A. y Distl, O. 2006. *Vet. J.* 172, 234-247.