

Identificación de un locus parálogo del gen *CD36* caprino con un perfil de expresión transcripcional complementario

Zidi, A.^{1*}, Castelló, A.^{1*}, Jordana, J.¹, Carrizosa, J.², Urrutia, B.², Serradilla, J.M.³ y Amills, M.¹

¹Centre de Recerca en Agrigenòmica, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193 Spain. ²Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA). Estación Sericícola. La Alberca, Murcia, Spain; ³Departamento de Producción Animal, Campus de Rabanales, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba, Spain.

* ambos autores han contribuido de forma equivalente

Ali.Zidi@uab.es

INTRODUCCIÓN

La molécula CD36 desempeña múltiples funciones fisiológicas relacionadas con el metabolismo lipídico y la respuesta inmune (Silverstein y Febbraio, 2007). En este sentido, cabe destacar que CD36 juega un papel importante en la captación y el transporte de ácidos grasos de cadena larga, presentando altos niveles de expresión durante el desarrollo de los adipocitos (Coburn et al., 2000). Desde el punto de vista inmunológico, CD36 está implicado en el proceso de fagocitosis de microorganismos y células apoptóticas (Hoebe et al., 2005; Ren et al., 1995). Se ha demostrado que ratones en los cuáles se ha inactivado el receptor CD36 son más sensibles a las infecciones por bacterias Gram-positivo (Akashi-Takamura y Miyake, 2008). Asimismo, en humano se ha observado que el polimorfismo del gen *CD36* está asociado a la susceptibilidad a la malaria (Das et al., 2009). Por otra parte, la actividad del receptor CD36 se ha vinculado a la secreción de citoquinas tanto anti- como pro-inflamatorias (Silverstein y Febbraio, 2009).

En el presente trabajo, se ha procedido a caracterizar el gen *CD36* caprino, identificándose, durante los experimentos de secuenciación, la existencia de una copia duplicada adicional (*CD36-like*). Ambos genes han sido caracterizados tanto a nivel estructural como transcripcional.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para caracterizar los genes caprinos CD36 y CD36-like, se extrajo RNA total a partir de muestras de hígado y glándula mamaria de cabras de las razas Murciano-Granadina (n = 3) y Malagueña (n = 3). La síntesis del cDNA se llevó a cabo mediante el kit ThermoScript RT-PCR System Kit (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los productos amplificados fueron secuenciados con el kit de secuenciación BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems), y analizados en un aparato de electroforesis capilar ABI Prism 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems).

Para determinar el perfil transcripcional de ambos genes en cinco tejidos (hígado, bazo, glándula mamaria, grasa y corazón) procedentes de cabras de la raza Murciano-Granadina, se implementó un protocolo de cuantificación absoluta. Los cebadores fueron diseñados con el programa Primer Express v. 2.0 (Applied Biosystems). Para evitar la amplificación de ADN genómico residual, al menos uno de los cebadores fue diseñado de modo que fuese complementario a la zona de unión de 2 exones consecutivos. Se construyeron curvas de calibración tomando como referencia productos RT-PCR cuya concentración había sido inferida mediante espectrofotometría a OD 260 nm (4 réplicas). Dichas medidas de concentración fueron transformadas a n^o de moléculas de cadena sencilla (ss). μL^{-1} , estableciéndose puntos de calibración entre 10¹⁰ ss moléculas. μL^{-1} y 1 ss moléculas. μL^{-1} . Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen total de 20 μl que contenía 5 μl de cDNA molde diluido 1:10-1:100, 300 nM de cebadores y el reactivo FastStart Universal Sybr Green master (Rox) (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Cada muestra se analizó por triplicado. El perfil térmico fue: 10 min a 95 °C y 40 ciclos de 15 seg a 95 °C y 1 min a 60 °C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La amplificación y la secuenciación parcial del cDNA del gen *CD36* caprino permitieron la identificación de dos secuencias distintas con una similitud aminoacídica del 84%. Al consultar las bases de datos GenBank y Ensembl, se comprobó que una de las secuencias obtenidas es ortóloga de los genes *CD36* humano, localizado en el cromosoma

7q11.2-qter (Calvo et al., 1995), y *CD36* bovino (ENSBTAT00000023750). Esta secuencia caprina, incluye la totalidad de la región codificante (1420 pb) y parte de la región reguladora 3'UTR (738 pb) de un gen *CD36*. La otra secuencia caprina (*CD36-like*) es ortóloga de un segundo gen *CD36* bovino localizado en el cromosoma 4 (ENSBTAG00000014220). La realización de un análisis filogenético bayesiano, incluyendo ambas secuencias *CD36* caprinas conjuntamente con otras secuencias *CD36* de mamíferos, permitió determinar que en bovino y caprino existen sendos genes *CD36-like*, que son parálogos del gen *CD36* y no poseen ortólogos en ninguna de las restantes especies analizadas. Ello sugiere que los genes *CD36-like* emergieron como resultado de una duplicación anterior a la radiación del bovino vs caprino (20 MYR).

Un gen duplicado puede sufrir distintos destinos, que van desde la inactivación funcional a la adquisición de una nueva función. Aunque el destino más habitual es el de convertirse en un pseudogen, mediante la acumulación de mutaciones deletéreas, existen diversos mecanismos a través de los cuales el gen duplicado puede evitar la inactivación funcional. Por ejemplo, el aumento de expresión asociado a la duplicación puede ser ventajoso desde un punto de vista selectivo (**redundancia funcional**). También puede suceder que la función del gen ancestral se distribuya entre las dos copias resultantes del proceso de duplicación (**subfuncionalización**), o que la copia duplicada adquiera una nueva función (**neofuncionalización**). El estudio de expresión mRNA en cinco tejidos caprinos distintos (glándula mamaria, bazo, hígado, corazón y grasa) demostró que ambos genes presentan un perfil de expresión que, en buena medida, resulta complementario (Tabla 1). De este modo, el gen *CD36* caprino presentó unos niveles de expresión particularmente elevados en tejido adiposo y corazón, siendo menores en glándula mamaria, > hígado > bazo (Tabla 1). Este perfil es similar al descrito para el gen *CD36* humano en UniGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene>). Por el contrario, el gen *CD36-like* caprino presentó un nivel de expresión muy alto en el hígado, ordenándose los distintos tejidos de la siguiente manera (Tabla 1): hígado > bazo > glandula mamaria > corazón > tejido adiposo. Estos resultados fueron confirmados mediante un experimento independiente de cuantificación relativa basado en el método $2^{-\Delta\Delta CT}$, en el que se utilizaron los genes de referencia β -actina y *HPRT1* (no se describen los resultados). Estos datos confirman que ambas copias del gen *CD36* se transcriben (por lo tanto, no ha habido pseudogenización) y, teniendo en cuenta que los perfiles de expresión son muy diferentes, tampoco parece que exista redundancia funcional. De hecho, la complementariedad en el perfil transcripcional de los genes *CD36* y *CD36-like* sugiere que han sufrido un proceso de subfuncionalización, acumulando mutaciones en regiones reguladoras que han provocado un cambio en la expresión tisular y una especialización funcional. La comparación de las secuencias correspondientes a las regiones 5' de los genes *CD36* y *CD36-like* bovinos demuestra que son muy distintas entre sí, apoyando dicha hipótesis. Por otra parte, se ha comprobado, mediante el programa cSNP (<http://www.pantherdb.org>), que en principio no resulta esperable que ninguna de las mutaciones que diferencian a las moléculas *CD36* y *CD36-like* caprinas provoque un cambio funcional. Asimismo, diversas posiciones aminoacídicas altamente conservadas en las proteínas *CD36* de mamíferos, también lo están en las moléculas *CD36-like*. Todo ello sugiere que los genes *CD36* caprinos no han experimentado un proceso de neofuncionalización, aunque debería hacerse pruebas funcionales para demostrarlo de forma convincente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akashi-Takamura & Miyake. 2008. Curr. Opin. Immunol. 20: 420-425;
- Calvo et al. 1995. Genomics 25:100-106.
- Coburn et al. 2000. J. Biol. Chem. 275: 32523-32529.
- Das et al. 2009. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 103: 687-690.
- Hoebe et al. 2005. Nature 433: 523-527.
- Ren et al. 1995. J. Exp. Med. 181: 1857-1862.
- Silverstein & Febbraio 2009. Sci. Signal 2:re3.

Tabla 1. Establecimiento del perfil de expresión mRNA de los genes *CD36* y *CD36-like* en cinco tejidos caprinos mediante un protocolo de cuantificación absoluta.

Tejido	Cuantificación Absoluta ¹	
	<i>CD36</i>	<i>CD36-like</i>
Hígado	43.347 ± 15.454	777.932 ± 91.371
Bazo	15.595 ± 3.386	4.192 ± 1.151
Glándula Mamaria	58.563 ± 5.177	686 ± 251
Corazón	314.302 ± 64.488	315 ± 196
Tejido adiposo	402.460 ± 66.737	21 ± 10

¹Numero de moléculas de mRNA/25 ng cDNA

Agradecimientos: Este trabajo de investigación se ha financiado en el contexto del proyecto CICYT AGL2007-66161-C02-02 concedido por el Ministerio de Ciencia e Innovación.

IDENTIFICATION OF A CAPRINE LOCUS PARALOGOUS TO THE *CD36* GENE WITH A COMPLEMENTARY TRANSCRIPTIONAL EXPRESSION PROFILE

ABSTRACT: The characterization of the goat *CD36* gene has allowed us to identify the presence of an additional duplicated copy (*CD36-like* gene). Bayesian phylogenetic analysis of mammalian *CD36* sequences evidenced the existence of two *CD36* and *CD36-like* clusters, with the latter encompassing exclusively sequences from goats and cattle. This result demonstrates that the *CD36* gene was duplicated prior to the divergence of cattle and goats (about 20 MYR). Dramatic differences were observed when analysing the tissue-specific mRNA expression of both caprine *CD36* and *CD36-like* genes by qPCR. In this way, *CD36* gene expression was higher in adipose tissue and heart, and lower in the mammary gland, liver and spleen. In contrast, *CD36-like* mRNA expression showed a complementary profile, being maximal in the liver and spleen. Altogether, these results suggest a scenario of subfunctionalization where the ancestral function of *CD36* was splitted between both *CD36* copies. Nevertheless, functional experiments are necessary to confirm this hypothesis.

Keywords: Goat, *CD36* gene, *CD36-like* gene, Duplication