

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DEL GEN DE LA ACETIL-CoA CARBOXILASA α (ACACA) EN LAS RAZAS OVINAS CHURRA Y OJALADA

García-Fernández, M., Gutiérrez-Gil, B., García-Gámez, E. y Arranz, J.J.
Dpto. Producción Animal, Facultad de Veterinaria. Universidad de León. Campus de Vegazana s/n, 24071 León. mgarf@unileon.es

INTRODUCCIÓN

La acetil-CoA carboxilasa α (ACACA) posee un papel fundamental en la síntesis de ácidos grasos de cadena larga catalizando la biotin-carboxilación de acetil-CoA para formar malonil-CoA. El malonil-CoA es el sustrato sobre el que actúa la Sintasa de ácidos grasos (FAS) que a través de siete reacciones de condensación cataliza la síntesis de ácido palmítico (Smith et al., 2003) y otros ácidos grasos de cadena larga (Leonard et al., 2000). A pesar de que esta enzima se expresa de forma general en el organismo, los mayores niveles de expresión se localizan en tejidos lipogénicos como el hígado, el tejido adiposo y la glándula mamaria durante el periodo de lactación. En este periodo se facilita la llegada de precursores para la síntesis de la grasa de la leche a la glándula mamaria mediante la represión de la ACACA en tejido adiposo y la inducción del mismo gen en la glándula mamaria (Barber et al., 1997).

El gen *ACACA* ovino se localiza en el cromosoma 11 (OAR11), posee 54 exones y codifica una proteína de 2346 aminoácidos (Barber y Travers, 1995). El importante papel de esta enzima en la síntesis de los ácidos grasos tanto a nivel de tejido muscular como mamario le sitúa como un importante candidato funcional para explicar parte de la variabilidad fenotípica observada en la composición tanto cualitativa como cuantitativa de la grasa de la carne o de la leche en el ganado ovino.

En función de lo expuesto, en el presente trabajo pretendemos analizar la variabilidad genética del gen *ACACA* en el ganado ovino. Estos resultados podrán ser empleados en el futuro para búsqueda de asociaciones entre formas alélicas del gen y la composición grasa de los productos derivados del ganado ovino (carne y/o leche).

MATERIAL Y MÉTODOS

Material animal: Para la búsqueda de variabilidad se utilizaron 24 hembras no relacionadas de raza Churra. Los SNPs detectados se genotiparon en 15 animales de las razas ovinas Churra y Ojalada, ambas con diferente aptitud productiva.

Obtención de cDNA: Para el estudio de la región codificante del gen *ACACA* se realizó la extracción del RNA total de glándula mamaria de 24 ovejas no relacionadas de raza Churra para su posterior retrotranscripción a cDNA (SuperScript™ III First-Strand Síntesis System for RT-PCR, Invitrogen™). El genotipado de los SNPs en las 2 razas ovinas estudiadas se realizó a partir de DNA genómico extraído de sangre completa mediante el protocolo estándar descrito en García-Fernández et al. (2009).

Secuenciación y detección de polimorfismos: Utilizando como referencia la secuencia del RNAm del gen *ACACA* ovino (GenBank Accession No NM001009256.1) se diseñaron 8 parejas de primers para amplificar una región de aproximadamente 4,3 Kb del gen *ACACA*. Los fragmentos resultantes fueron purificados mediante digestión con ExoSAP-IT (USB Corporation, Cleveland, Ohio). La reacción de secuenciación cíclica se llevó a cabo utilizando los mismos primers que se emplearon para la amplificación y el kit de secuenciación "BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit" (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las reacciones fueron procesadas en un 3130 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) y las secuencias obtenidas se analizaron con el software SeqScape v2.5 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Análisis genotípico: Los SNPs identificados se genotiparon mediante secuenciación directa del DNA de 15 animales de cada una de las 2 razas ovinas estudiadas utilizando los mismos primers que para la detección de los polimorfismos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se puede observar en la Figura 1, se ha secuenciado la mayoría de la región codificante del gen *ACACA* ovino (exones 1 a 35) y se han localizado 11 SNPs sinónimos. Las posiciones de los mismos se muestran en la Figura 1.

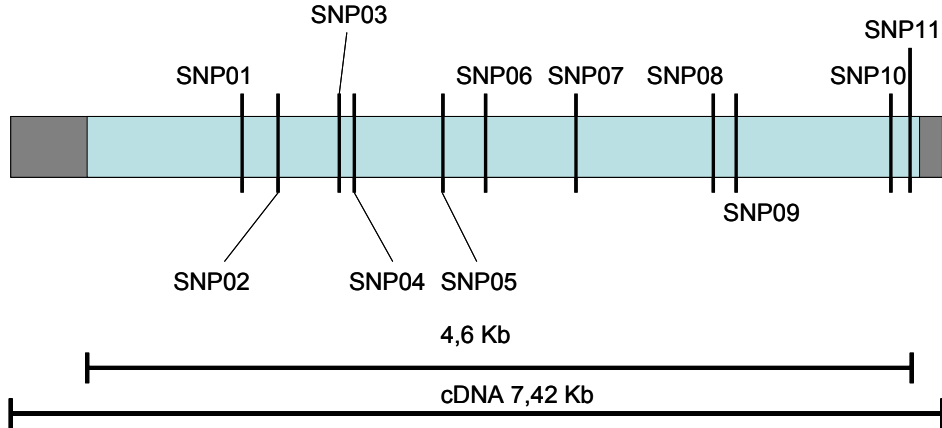


Figura 1. Representación esquemática del cDNA del gen *ACACA* (rectángulo gris) del fragmento amplificado (rectángulo azul) y de la posición de los 11 SNPs localizados.

En la Tabla 1 se muestran las frecuencias alélicas de los 11 polimorfismos detectados en las dos razas analizadas. La variabilidad media del gen ha sido elevada ya que se han detectado 11 SNPs en un total de 4.600 bp analizados con una media aproximada de 1 SNP cada 420 bp analizados en los 24 animales secuenciados. La variación observada es mayor que la media detectada en otros genes candidatos secuenciados en la misma muestra de animales (datos en preparación). Como se puede observar en la Tabla 1 la información de los SNPs es heterogénea. Así se han detectado 5 polimorfismos con una frecuencia del alelo raro (*Minor allele frequency*, MAF) superior a 0.2 en ambas poblaciones (SNP01, SNP04, SNP06, SNP07 y SNP11), siendo el más informativo el SNP06 donde el valor medio de MAF ha sido de 35.5%.

Tabla 1. Frecuencias alélicas de los SNPs detectados en las razas Churra y Ojalada. La frecuencia mostrada se refiere al alelo que presenta una menor frecuencia en la raza Churra

	Churra	Ojalada	Frec. media
SNP01	0,42	0,87	0,275
SNP02	0,05	0,05	0,05
SNP03	0,16	0,21	0,185
SNP04	0,19	0,25	0,22
SNP05	0,08	0,11	0,095
SNP06	0,25	0,46	0,355
SNP07	0,21	0,38	0,295
SNP08	0,04	0	0,02
SNP09	0,04	0	0,02
SNP10	0,1	0,04	0,07
SNP11	0,3	0,13	0,215
Frecuencia media por raza	0,17	0,23	

Los otros SNPs han sido menos informativos destacando los SNP08 y SNP09 que únicamente han mostrado variabilidad en el caso de la población de raza Churra. Este efecto puede ser debido al diferente tamaño muestral analizado en las dos poblaciones (39 animales en Churra frente a 15 de Ojalada). Por lo que respecta a las diferencias alélicas hay que destacar el SNP01 dónde el mismo alelo ha presentado una frecuencia de 0.42 en Churra y 0.87 en Ojalada, razas con diferente especialización. Es difícil dar una interpretación funcional a los resultados dado que estamos en el estudio de detección de variabilidad y se han estudiado pocos animales. El uso de estos SNPs como marcadores en futuros estudios de asociación nos podrá dar una idea de la importancia funcional de los mismos en relación a la composición de la grasa de los productos ovinos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barber, M. C., Clegg, R. A., Travers, M. T. & Vernon, R. G. 1997. *Biochem. Biophys. Acta.* 1347:101-126.
- Kong, I.S., Lopez-Casillas, F. & Kim, K. H. 1990. *J. Biol. Chem.* 265: 13695-13701.
- Salles, J., Sargueil, F., Knoll-Gellida, A., Witters, L.A., Casagne, C. & Garbay, B. 2003. *Biochim. Biophys. Acta;* 1631: 229-238.
- Barber, M. C., Pooley, L. & Travers, M. T. 2001. *J. Mol. Endocrinol.* 27: 349-356.
- Smith, S., Witkowski, A. & Joshi, A. K. 2003. *Prog Lipid Res.* 42 289-317.
- Leonard, A. E., Pereira, S. L., Sprecher, H. & Huang, Y. S. 2004. *Prog Lipid Res.* 43: 36-54.
- Barber, M. C., Clegg, R. A., Travers, M. T. & Vernon, R. G. 1997. *Biochem. Biophys. Acta.* 1347: 101-126.
- Barber, M. C. & Travers, M. T. 1995. *Gene.* 154: 271-275.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido cofinanciado por el proyecto AGL2005-04321 del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) y del Proyecto GR43 de la Junta de Castilla y León para grupos de excelencia. Elsa García Gámez disfruta de un contrato para Investigadores jóvenes de la Junta de Castilla y León cofinanciado por el Fondo Social Europeo. Marta García Fernández es becaria FPI (MICINN). Beatriz Gutiérrez Gil disfruta de un Contrato del Programa Juan de la Cierva (MICINN).

GENETIC VARIABILITY IN THE ACETYL-CoA CARBOXYLASE GENE IN CHURRA AND OJALADA SHEEP BREEDS.

ABSTRACT: Acetyl-CoA carboxylase (ACACA) is the rate-limiting enzyme in the biosynthesis of long-chain fatty acids. We have sequenced about 4.6 kb of the ovine *ACACA* cDNA, which included partial exon 1 to exon 35, in order to detect SNP. A total of 11 synonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified in the analysed sequence. After that the frequency of this 11 SNPs were verified in 2 Spanish sheep breeds with different production goal (Churra and Ojalada). The genetic variability of the gene is higher than other candidates analysed in sheep with a SNP every 420 bp. Five of the polymorphisms displays a high informativity in both populations and one of them is breed-specific (SNP09 in Churra) The characterization of the allelic variants reported herein laid the basis for further association analyses needed to evaluate the potential use of these SNPs as genetic markers for fat content and fatty acid composition of sheep products.

Keywords: *Acetyl-CoA carboxylase, sheep, single nucleotide polymorphism.*